

VTT Technical Research Centre of Finland

Fermentointiprosessin optimointi voihapsen tuottamiseksi elintarviketeollisuuden sivuvirroista

Turunen, Rosaliina

Published: 01/09/2019

Document Version
Publisher's final version

[Link to publication](#)

Please cite the original version:

Turunen, R. (2019). *Fermentointiprosessin optimointi voihapsen tuottamiseksi elintarviketeollisuuden sivuvirroista*. [Metropolia University of Applied Sciences].



VTT
<http://www.vtt.fi>
P.O. box 1000FI-02044 VTT
Finland

By using VTT's Research Information Portal you are bound by the following Terms & Conditions.

I have read and I understand the following statement:

This document is protected by copyright and other intellectual property rights, and duplication or sale of all or part of any of this document is not permitted, except duplication for research use or educational purposes in electronic or print form. You must obtain permission for any other use. Electronic or print copies may not be offered for sale.



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Rosaliina Turunen

Fermentointiprosessin optimointi voihapon tuottamiseksi elintarviketeollisuuden sivuvirroista

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinöörityö

26.8.2019

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Rosaliina Turunen Fermentointiprosessin optimointi voihapsen tuottamiseksi elintarviketeollisuuden sivuvirroista 45 sivua + 5 liitettä 26.8.2019
Tutkinto	insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma	bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine	bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat	tutkija Kiira Vuoristo tutkija Tiina Hyytiäinen tutkimustiimin päällikkö Jaana Uusitalo tutkintovastaava Carola Fortelius-Sarén
<p>Tämä insinöörityö tehtiin Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy:n toimeksiantona osana Suomen Akatemian rahoittamaa BIOCHEM-projektia. Työssä tutkittiin, onko elintarviketeollisuuden sivuvirtoja mahdollista hyödyntää fermentointiprosessissa voihapsen tuottamiseksi. Tutkimus koostui kolmesta päävaiheesta, jotka olivat 1) voihapsen tuottavien organismien seulonta, 2) sivuvirtojen esikäsittelymenetelmien määrittäminen ja 3) kasvatusolosuhteiden optimointi mahdollisimman korkean voihapsen tuotannon saavuttamiseksi. Työn tavoitteena oli suunnitella toimiva fermentointiprosessi, jota voitaisiin hyödyntää projektin seuraavissa vaiheissa, joissa tutkitaan menetelmiä voihapsen erottamiseksi fermentointiliuoksesta sekä mitoitetaan fermentointiprosessi suurempaa mittakaavaan.</p> <p>Työssä seulottiin potentiaalisia organismeja VTT:n kantakokoelmasta ja valittuja bakteerikantoja, <i>Megasphaera cerevisiae</i> ja <i>Pediococcus pentosaceus</i>, kasvatettiin anaerobisesti erillis- sekä yhteisviljelynä pulloissa ja bioreaktoreissa. Kasvatusten aikana seurattiin solumassan kasvua, substraattien kulutusta sekä tuotteiden muodostumista. Kantojen tuottama voihapsen tuotantoa pyrittiin nostamaan säätämällä kasvualustan koostumusta sekä kasvatusolosuhteita.</p> <p>Tutkimuksessa selvisi, että <i>M. cerevisiae</i> -kannan ja <i>P. pentosaceus</i> -kannan yhteisviljelyssä päästiin korkeampiin voihapsen tuotantoihin kuin <i>M. cerevisiae</i> -kannan yksittäisessä viljelyssä. Kasvatuksia tehtiin useilla eri sivuvirta-RCM-kasvatusalustoilla asetaattipuskurin kanssa ja ilman. Käytetyllä sivuvirralla ei ollut huomattavaa vaikutusta voihapsen muodostumiseen. Sen sijaan asetaattipuskurin pois jättäminen laski kasvatusten voihapsen tuotantoa lähes puolella. Korkein tiiteri ja tuottavuus (7,5 g/l, 0,34 g/l/t) saavutettiin kantojen yhteisviljelyssä asetaattipuskuroidulla kaali-omena-RCM-kasvatusalustalla panosfermentoinnissa. Panos-syöttöfermentoinnissa sivuvirran syöttäminen ei näyttänyt parantavan voihapsen tuottoa, vaan lisäsi muiden aineenvaihduntatuotteiden muodostumista. Koska <i>M. cerevisiae</i> ja <i>P. pentosaceus</i> -kantojen yhteisviljelyn aineenvaihduntareittejä aletaan vasta ymmärtää, lisätutkimuksia tarvitaan vielä fermentointiprosessin optimoimiseksi.</p>	
Avainsanat	elintarviketeollisuuden sivuvirrat, fermentointi, <i>Megasphaera cerevisiae</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , voihamppu, yhteisviljely

Author Title Number of Pages Date	Rosaliina Turunen Optimization of the Fermentation Process to Produce Butyric Acid From Food Industry Side Streams 45 pages + 5 appendices 26 August 2019
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Chemical Engineering
Professional Major	Biotechnology and Food Engineering
Instructors	Kiira Vuoristo, Research Scientist Tiina Hyytiäinen, Research Scientist Jaana Uusitalo, Research Team Leader Carola Fortelius-Sarén, Head of Biotech. and Food Eng. Dept.
<p>This thesis was made for VTT Technical Research Centre of Finland Ltd as a part of BIO-CHEM project that was funded by Academy of Finland. It was examined if it is possible to use food industry side streams as a substrate for butyric acid fermentation. This study consisted of three main stages that were 1) screening for organisms which have the ability to produce butyric acid, 2) determining pretreatment methods of side streams and 3) finding the highest possible concentration of butyric acid by optimizing the culture conditions. The objective of this thesis was to define a functional fermentation process that could be exploited in the next part of the project, which aims to study the methods to separate butyric acid from fermentation broth and scale up the fermentation process.</p> <p>Potential organisms from VTT's culture collection were screened and the selected bacterial strains, <i>Megasphaera cerevisiae</i> and <i>Pediococcus pentosaceus</i>, were anaerobically cultured in bottle and bioreactor scale. Cell growth, utilization of substrate and production of metabolites was monitored during fermentations. The object was to increase the concentration of butyric acid by adjusting the media and growth conditions.</p> <p>This study shows that the co-culture of <i>M. cerevisiae</i> and <i>P. pentosaceus</i> resulted in higher concentrations of butyric acid than the single culture of <i>M. cerevisiae</i>. Cultivations were done with several side stream enriched RCM media with and without an acetate buffer. There were not considerable differences between side streams, but in cultivations done without the acetate buffer, the concentration of butyric acid was significantly lower than in cultivations done with the acetate buffer. The highest titer and productivity (7,5 g/L, 0,34 g/L/h) was accomplished in batch fermentation in the cabbage-apple-RCM-medium with the acetate buffer. In fed-batch fermentation, the feeding did not improve the production of butyric acid, but it resulted in the formation of other metabolites. Because we are just starting to understand the metabolic routes in the co-culture of <i>M. cerevisiae</i> and <i>P. pentosaceus</i>, the optimization of the fermentation process requires more research.</p>	
Keywords	food industry side streams, fermentation, <i>Megasphaera cerevisiae</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , butyric acid, co-culture cultivation

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Elintarviketeollisuuden sivuvirrat	4
2.1	Sivuvirrat kiertotalouden näkökulmasta	4
2.2	Jätteestä arvokemikaaleja fermentoimalla	6
3	Voihappo bakteerien aineenvaihduntatuotteena	9
3.1	Voihapon tuottajabakteerit	9
3.2	Yhteisviljely voihapon tuotannossa	11
3.3	Voihapon tuottomekanismit	12
4	Materiaalit ja menetelmät	15
4.1	Yleistä	15
4.2	Bakteerikannat	15
4.3	Kasvatusolosuhteiden valintaprosessi	15
4.4	Bakteerikantojen voihapon sietokyvyn testaaminen	17
4.5	Sivuvirtojen esikäsittely	17
4.5.1	Kaalin ja omenan esikäsittely	18
4.5.2	Mäskin esikäsittely	18
4.6	Sivuvirta-RCM-kasvatusalustojen valmistus	19
4.7	Minimaalialustan valmistus	20
4.8	Pullo- ja bioreaktorikasvatukset	20
4.8.1	Inokulaatin tilavuuden määrittäminen	21
4.8.2	Pullokasvatusten olosuhteet	21
4.8.3	Bioreaktoriolosuhteet	21
4.9	Analyttiset menetelmät	22
4.9.1	Absorbanssi ja pH	22
4.9.2	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia	23
4.9.3	Kaasukromatografia	24

4.9.4	Massaspektrometria	24
5	Tulokset	25
5.1	Bakteerikantojen seulonta	25
5.2	Pullokasvatukset	27
5.2.1	Yhteisviljelyn toimivuus valituilla kannoilla	27
5.2.2	Pullokasvatukset kaali- ja lanttu-RCM-alustoilla	28
5.2.3	Pullokasvatukset omena- ja kaali-omena-RCM-alustoilla	29
5.2.4	Pullokasvatukset mäski-RCM-alustoilla	30
5.3	Bioreaktorikasvatukset	31
5.3.1	Alustan ja syötön optimointi	31
5.3.2	Asetaattipuskurin vaikutus voi happopitoisuuteen	33
6	Tulosten tarkastelu	35
7	Yhteenveto	41
	Lähteet	42
	Liitteet	
	Liite 1. Biologisten tekijöiden luokitus	
	Liite 2. Kasvatusalustojen koostumukset	
	Liite 3. Kaali-RCM-fermentoinnin hiilidioksidikäyrät	
	Liite 4. Bakteerikantojen seulonta – substraattien kulutus ja kasvukäyrät	
	Liite 5. Fermentointinäytteiden sokeri- ja happopitoisuudet	

Lyhenteet

ATP	Adenosiinitrifosfaatti. Solujen energianlähde.
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas. Aineenvaihduntareitti, jossa glukoosi muutetaan pyruvaatiksi.
ETL	Elintarviketeollisuusliitto. Edustaa Suomessa toimivia ruoka- ja juomatuotteiden valmistajayrityksiä.
FDA	Food and Drug Administration. Yhdysvaltalainen elintarviketurvallisuusvirasto.
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> eli korkean erotuskyvyn nestekromatografia.
NADP	Nikotiinihappoamidiadeniininukleotidifosfaatti. Koentsyymi solujen hapetus-pelkistysreaktioissa.
PFOR	Pyruvaatti-ferredoksiini-oksidoreduktaasi. Solujen aineenvaihdintareaktioita katalysoiva entsyymi.
PIPES	Piperatsiini-N,N'-bis-2-etaani-sulfonihappo. Epäorgaaninen puskuri.
RCM	<i>Reinforced Clostridial Medium</i> . Erityisesti klostrideille ja muille anaeroobeille suunniteltu kasvatusalusta.

1 Johdanto

Tämä insinöörityö tehtiin Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy:n toimeksiantona. VTT on tutkimus- ja kehitysorganisaatio, joka tuottaa innovatiivisia ratkaisuja sekä yrityksille että julkiselle sektorille. Insinöörityö toteutettiin osana Suomen Akatemian rahoittamaa BIOCHEM-projektia, jonka tavoitteena on muuntaa jätevirtoja arvokemikaaleiksi fermentointitekniikan avulla. BIOCHEM-projekti toteutetaan kolmen tutkimuslaitoksen yhteistyönä: University of Santiago de Campostella (Espanja), Hamburg University of Technology (Saksa) ja Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy (Suomi). Tarkoituksena on kehittää uudenlaisia bioprosesseja hyödyntäen usean bakteerikannan yhteisviljelyä. Substraatteina käytetään jätevirtoja ja haluttujen tuotteiden korkea tuottavuus sekä selektiivisyys pyritään saavuttamaan optimoimalla olosuhteita bioreaktorissa. Projektipartnerien kanssa pyritään mallintamaan organismien aineenvaihduntareitit yhteisviljelyssä sekä kehittämään fermentointiprosessiin jatkuvatoiminen erotusmenetelmä, jolla voidaan vähentää tuotteiden inhiboivaa vaikutusta. Tässä insinöörityössä haluttu tuote on voihappo.

Voihappo (C_3H_7COOH) on lyhytketjuinen rasvahappo. Se on huoneenlämpöisenä kirkas neste, jolle tunnusomaista on voimakas ja epämiellyttävä haju. Voihapon estereitä esiintyy luonnossa eläinrasvoissa sekä joissain kasviöljyissä. [1, s. 322.] Sillä on lukuisia käyttökohteita eri teollisuuden aloilla kuten rehu- ja elintarviketeollisuudessa aromiaineina ja kemianteollisuudessa muovin valmistuksessa. Voihappoa tuotetaan vuosittain arviolta 50 000 tonnia pääasiassa hapettamalla butanaalia, jota saadaan raakaöljyn oksosynteesissä muodostuvasta propeenista. [2, s. 68.] Tämä kemiallinen synteesi on tällä hetkellä yleisimmin käytetty valmistusmenetelmä sen edullisen hinnan ja materiaalien hyvän saatavuuden vuoksi. Fossiilisten polttoaineiden väheneminen ja raakaöljyn alati nouseva hinta ovat herättäneet kiinnostusta tuottaa voihappoa mikrobiologisesti fermentoimalla uusiutuvia luonnonvaroja. [1, s. 322.] Biotekniikan prosesseissa myös energiankulutus on usein kemiallisiin prosesseihin verrattuna alhaisempaa, sillä prosessilämpötilat ja paineet ovat matalampia [3, s.373]. Lisäksi asiakkaiden uskotaan suosivan luonnonmukaisesti tuotettua voihappoa ruoan lisäaineena tai kosmetiikan raaka-aineena kemiallisesti tuotetun voihamon sijaan [1, s. 322].

Useat bakteerit tuottavat voihippaa anaerobissa olosuhteissa. Voihipon tuottaminen bioreaktorissa ei ole kuitenkaan ongelmallista, sillä voihippaa aineenvaihduntatuotteena tuottavat bakteerit ovat vaativia kasvuolosuhteiden ja ravinteiden suhteen. [4, s. 2.] Kahden tai useamman bakteerikannan yhteisviljelyllä voidaan saada merkittävää etua, sillä onnistuessaan se nostaa tuotteiden saantoa ja laatua sekä tarjoaa mahdollisuuden käyttää edullisempia ravinnonlähteitä kuten teollisuuden sivuvirtoja [3, s. 373]. Elintarviketeollisuus on yksi suurimmista teollisuuden aloista, ja maailmanlaajuisesti koko ruokaketjussa syntyy 1,3 miljardia tonnia ruokajätettä vuosittain. Hyödyntämällä teollisuudessa syntyviä sivuvirtoja voihipon valmistamiseen siirrytään pois fossiilisten polttoaineiden käytöstä samalla kun kehitetään uusia tapoja hyödyntää jätettä. [5, s. 329–330.]

Sivuvirtojen hyödyntäminen voihipon tuotannossa ei ole uusi ilmiö, sillä jo 1980-luvulla todettiin, että maitoteollisuuden sivuvirroista, kuten herasta, voidaan tuottaa voihippaa panosfermentoinnissa hyödyntäen *Clostridium*-suvun bakteereita. 2000-luvulla kiinnostusta on herättänyt myös erilaiset lignoselluloosapohjaiset materiaalit, kuten vehnän, rypsin ja riisin korret sekä maissi- ja sokeriruokokuidut [6, s. 346]. Yksittäisten bakteerikantojen lisäksi sekaviljelmien potentiaalia voihipon tuotannossa on selvitetty useissa tutkimuksissa ja vaikka saannot ovat useimmiten olleet alhaisempia kuin yksittäisillä kannoilla, sekaviljely tarjoaa muita etuja valmistusprosessiin. Sen etuna on pienempi kontaminaatoriski ja laajempi ravinnonlähteiden kirjo, joten sitä voidaan hyödyntää myös heterogeenisten materiaalien kuten ruokajätteen käsittelyssä. [7, s. 278.]

Vaikka yhteisviljely voi olla ratkaisu voihipon tuottamiseen bioreaktorissa, sen hallinta on yleensä hankalaa johtuen kantojen erilaisista kasvuominaisuuksista, aineenvaihduntatuotteiden sietokyvystä ja mahdollisesta kilpailusta ravintoaineiden suhteen. Jotta optimaaliset prosessiparametrit kuten riittävän alhainen happipitoisuus, pH, lämpötila ja substraatin määrä voidaan asettaa, tulee tuntea kunkin bakteerikannan yksilöllinen aineenvaihduntatuotteiden sietokyky ja huomioida mahdolliset vuorovaikutukset eri kantojen aineenvaihduntatuotteiden välillä. [8, s. 500.]

Tässä tutkimuksessa tavoitteena oli seuloa viiden organismin joukosta potentiaalisimmat kannat yhteisviljelyyn ja optimoida fermentointiprosessi parhaimman mahdollisen tuoton saavuttamiseksi. Fermentointiprosessin optimoinnilla tarkoitetaan tässä työssä lämpötilan, pH:n, substraatin (tässä tapauksessa sivuvirran) esikäsittelyn ja syöttönopeuden

määrittämistä siten, että voihapon saanto saadaan nostettua mahdollisimman korkeaksi. Tutkimus rajattiin koskemaan vain 1. vaarallisuusluokan mikrobeja, jotta työskentely fermentointihallissa ja mahdollisesti myöhemmin teollisuudessa olisi turvallista ilman eriytystä suojautumista. Mikrobien vaarallisuusluokat on esitelty liitteessä 1.

2 Elintarviketeollisuuden sivuvirrat

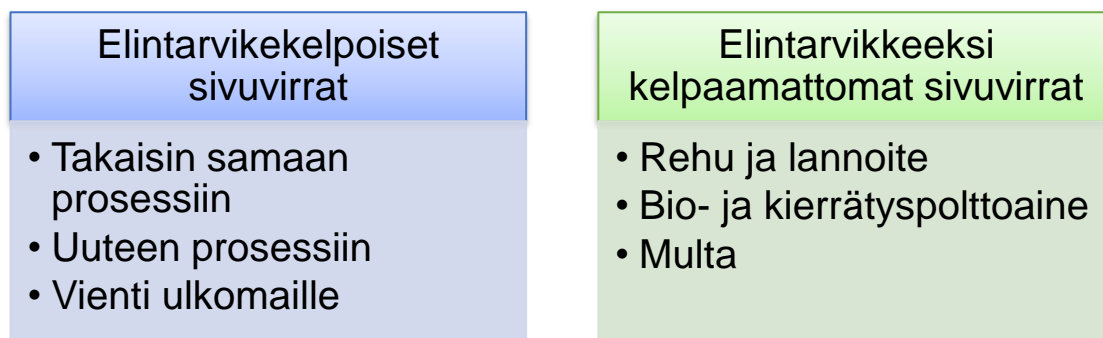
2.1 Sivuvirrat kiertotalouden näkökulmasta

Tämän hetkinen megatrendi on kiertotalous, jossa ylijäämämateriaaleja ei hävitetä käytön jälkeen, vaan niille keksitään uusia käyttökohteita [9, s. 9]. Elintarviketeollisuudessa syntyy useita tällaisia materiaalivirtoja kuten hedelmä- ja kasvismehujen puristuksessa syntyvä jäte. Näitä materiaalivirtoja kutsutaan sivuvirroiksi. Niiden syntymistä ei voida täysin välttää, joten niiden sisältämät ravinteet ja energia pyritään saamaan takaisin kiertoon. [10, s. 3–4.] YK:n elintarvike- ja maatalousjärjestö [11, s. 4] (FAO, engl. Food and Agriculture Organization) arvioi vuonna 2011, että kolmannes ruokaketjussa liikkuvasta ruoasta päätyy ruokahävikiksi. Suurin osa ruokajätteestä päätyy kaatopaikoille tai hävitetään polttamalla, jolloin niiden sisältämiä ravintoaineita ei saada hyötykäyttöön [7, s. 278]. Kiertotalous on välttämätöntä ympäristön säilyvyyden kannalta, sillä se vähentää samanaikaisesti raakamateriaalin kulutusta ja syntyvän jätteen määrää [12, s. 773].

Suomen itsenäisyyden juhlarahasto Sitra [9, s. 12–15] esittää kiertotalouden tiekartassaan, että kiertotaloutta tulisi edistää kestäväällä ruokajärjestelmällä ja teknisillä kierroilla. Kestävän ruokajärjestelmän lähtökohtana on ruokahävikin vähentäminen koko ruokaketjussa. Syntyvän biojätteen elinkaarta tulisi jatkaa hyödyntämällä sitä uudessa kierrossa. Uusilla, teknisillä kierroilla pyritään minimoimaan neitseellisten raaka-aineiden käyttö ja parantamaan materiaalien uudelleenkäyttömahdollisuuksia. Suomessa syntyvien elintarviketeollisuuden sivuvirtojen määrää ja laatua on tutkittu vain vähän, sillä aiemmin jätteiden kirjaamista edellytettiin vain yrityksiltä, joilla on viranomaisten myöntämä ympäristölupa. [10, s. 5.] Nykyään myös kuntien tulee raportoida syntyvistä jätteistä ympäristönsuojelun valvonnan sähköiseen asiointijärjestelmään [13]. Raportointivastuun ulkopuolelle jää kuitenkin monia pienempiä elintarvikealan yrityksiä. Vuonna 2014 järjestelmään raportointiin yhteensä noin 390 000 tonnia sivuvirtoja. [10, s. 5–6.]

Elintarviketeollisuuden sivuvirtojen sisältämiä arvokomponentteja (esimerkiksi energia-ravintoaineita, vitamiineja ja kivennäisaineita) hyödynnetään pääasiassa energian tuottamiseen tai kierrättämällä ne takaisin tuotantoon [10, s. 9–10]. Syntyvät sivuvirrat ovat hyvin erilaisia olomuodoiltaan ja koostumukseltaan, joten niiden käsittely- ja loppukäyt-

tökohteet vaihtelevat [14, s. 10–11]. Elintarvikkeeksi kelpaavia sivuvirtoja ovat esimerkiksi tuotevaihdossa syntyvät ylijäämäpalat tai teurasteollisuudessa syntyvät vähempiarvoiset ruhon osat. Ylijäämäpaloja voidaan joissain tapauksissa palauttaa elintarvikkeen valmistusprosessiin tai vaihtoehtoisesti niitä voidaan hyödyntää uuden tuotteen valmistuksessa (kuva 1). [10, s. 10–11.]



Kuva 1. Elintarviketeollisuuden sivuvirtojen yleisimpiä käyttökohteita Suomessa [10; 14].

Esimerkiksi juuston valmistuksessa syntyvistä ylijäämäpaloista voidaan valmistaa sulatejuustoa tai Suomessa vähemmän arvostettuja ruhonosia (esimerkiksi sisäelimet) voidaan viedä maihin, jossa ne ovat osa ruokakulttuuria. Vaihtoehtoisesti vähemmän arvostetuista ruhon osista voidaan valmistaa erilaisia eineksiä kuten pihvejä ja pyöryköitä. [10, s. 10.]

Elintarvikealan yrityksissä syntyy myös sivuvirtoja, jotka eivät ole elintarvikekelpoisia. Perinteisesti yritykset ovat ohjanneet ne maatalouden käyttöön, jossa niitä hyödynnetään peltojen lannoitteena sekä tuotantoeläinten rehuna. Sekä eläin- sekä kasvipäriset sivuvirrat käytetään usein rehun raaka-aineena. [10, s. 11.] Vaikka elintarviketeollisuuden sivuvirroille on useita käyttökohteita, osa ruokajätteestä päättyy kaatopaikoille [5, s. 329]. Yksityistaloudet sekä yritykset tuottavat jatkuvasti suurempia määriä orgaanista jätettä, ja ruokahävikki on maailmanlaajuinen ongelma [15, s. 70]. Ruokahävikkiä käsitellään kompostoimalla, polttamalla tai fermentoimalla. Ruokahävikin fermentoinnissa pääasiallinen sovellus on biokaasun tuottaminen. Biokaasua käytetään sähkön- ja lämmöntuotantoon sekä liikenteen polttoaineena. [5, s. 329.] Toisen yrityksen ruokahävikin tai muiden sivuvirtojen hyödyntäminen oman yrityksen raaka-aineena on kiertotaloutta parhaimmillaan ja voi tarjota mahdollisuuden yrityksen kasvuun. Tämä vaatii kuitenkin

onnistuaakseen saumatonta yhteistyötä eri toimialojen välillä. Biokaasun tuotannon osalta prosessi on saatu toimivaksi, sillä siihen ohjautuvat useiden eri toimialojen kuten teollisuuden, kaupan ja maatalouden biopohjaiset materiaalit. [16, s. 14.]

2.2 Jätteestä arvokemikaaleja fermentoimalla

Kuten edellä todettiin, ruokahävikin käsittelyssä fermentointitekniikkaa hyödynnetään pääasiassa biokaasun tuottamiseen. Koska biokaasun lisäksi kysyntää on myös muille, arvokkaammille, orgaanisesti tuotetuille materiaaleille, tarvitaan toimivia fermentointiprosesseja myös arvokemikaalien, kuten lyhytketjuisten rasvahappojen valmistukseen [5, s. 329]. Lyhytketjuiset rasvahapot kuten etikka-, propaani- ja voihapo ovat jo sellaisenaan arvokkaita primäärisiä aineenvaihduntatuotteita, mutta toimivat usein myös välituotteena sekundäärisille aineenvaihduntatuotteille kuten etanolille ja kapronihapolle [15, s. 70]. Yleisesti lyhytketjuisia rasvahappoja valmistetaan kemiallisissa prosesseissa, jotka perustuvat uusiutumattomiin petrokemiallisiin materiaaleihin [12, s. 774]. Mikäli raakaöljyn käyttöä jatketaan entiseen malliin, on ennustettavissa öljykriisi, sillä öljyvarantojen määrä on niiden käyttöön verrattuna alhainen [15, s. 70]. Lisäksi fossiilisten polttoaineiden käyttöä tulisi vähentää, niistä johtuvien hiilidioksidipäästöjen vuoksi [7, s. 278].

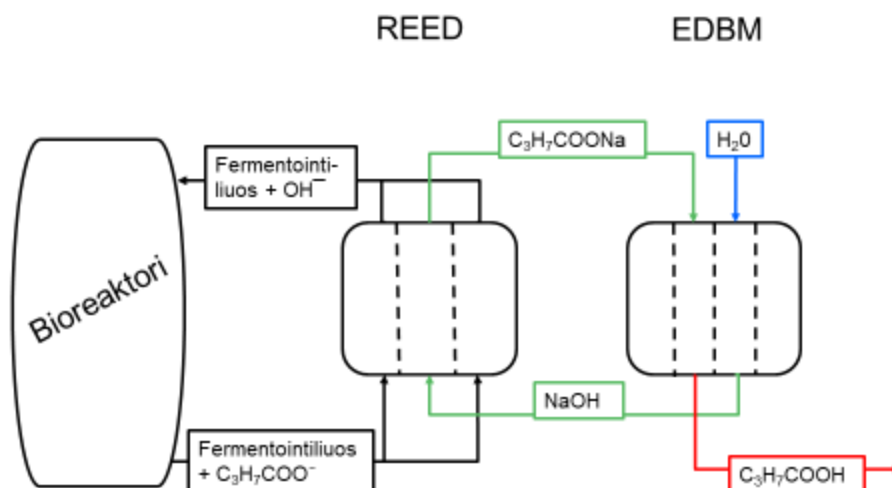
Osa teollisuuden käyttämistä kemikaaleista olisi mahdollista korvata vastaavilla tuotteilla, jotka on valmistettu fermentoimalla uusiutuvista luonnonvaroista [7, s. 278]. Tällä hetkellä lyhytketjuisia rasvahappoja tuotetaan sekä fermentoimalla että synteettisesti. Noin 90 % tuotannosta perustuu kemialliseen synteesiin, mutta osa teollisuuden aloista kuitenkin suosii jo nyt biopohjaisia vaihtoehtoja. Koska synteettisesti valmistettua voi-happoa ei voida pitää luonnontuotteena, sitä ei juurikaan hyödynnetä ruoka- ja juomateollisuudessa. Kun yhdysvaltalainen elintarviketurvallisuusvirasto Food and Drug Administration (FDA) hyväksyi biopohjaisen voihapsen käytön elintarvikkeissa aromiaineena, sen luonnonmukainen valmistus fermentoimalla lisääntyi. [12, s. 774–775.]

Fermentointi ei voi kuitenkaan taloudellisesti kilpailla synteettisen valmistusmenetelmän kanssa, sillä tuotantotasot ovat alhaiset [12, s. 775]. Fermentoinnissa lyhytketjuisten rasvahappojen saannot jäävät usein alhaisiksi, sillä niiden korkeat pitoisuudet kasvatusalustassa inhiboivat bakteerien kasvua, jolloin tuottavuus laskee [5, s. 330]. Lisäksi fermentointiliuoksen jälkikäsittely on kallista, sillä lyhytketjuisten rasvahappojen talteenotto on

teknisesti haastavaa. Usein prosessissa syntyy useita eri yhdisteitä, joiden erottaminen fermentointiliuoksesta sekä puhdistaminen kattavat suurimman osan tuotantokustannuksista. [17, s. 168.] Siirtyminen biopohjaisiin valmistusmenetelmiin taloudellisesta asemasta huolimatta on tärkeää, sillä se auttaisi osaltaan pääsemään Pariisin ilmastositoumuksen tavoitteisiin maapallon lämpötilan nousun pysäyttämiseksi [12, s. 775].

Haasteena on luoda kustannustehokas fermentointimenetelmä lyhytkestuisten rasvahappojen tuottamiseksi [18, s. 62]. Operointiolosuhteet (pH, lämpötila, substraatti ja sen määrä, prosessin kesto) vaikuttavat tuotteiden muodostumiseen. Lisäksi valitut olosuhteet vaikuttavat toisiinsa. Esimerkiksi käytetty substraatti vaikuttaa prosessointiaikaan. Toisaalta eri substraateilla voi olla myös yhtenäinen prosessointiaika, jos olosuhteet ovat muuten erilaiset. Optimaalisten operointiolosuhteiden löytäminen voi olla siis haastavaa. Olosuhteiden lisäksi fermentointiin valittu yksittäinen mikrobikanta tai useammasta kannasta koostuva mikrobikirjasto vaikuttavat muodostuvien tuotteiden saantoon ja jakamaan. [12, s. 775–777.]

Kun fermentointiliuoksen voi happopitoisuus kohoaa fermentoinnin aikana, se vaikuttaa negatiivisesti voi hapon tuottoon, sillä korkea voi happopitoisuus häiritsee bakteerien kasvua. Jatkuvat oimimisella erotusmenetelmällä voidaan vähentää voi hapon inhiboivaa vaikutusta. [19, s. 318.] Lyhytkestuisten rasvahappojen talteenotto monitahoisesta fermentointiliuoksesta on haastavin osa tuotantoketjua, mutta erotusmenetelmät kehittyvät kuitenkin koko ajan [12, s. 779; 15, s. 77]. Esimerkiksi käänteisellä elektrodialyysillä eli REED:llä (Reverse Electro Enhanced Dialysis) on raportoitu yli 90 %:n erotustehokkuuksia [19, s. 323]. Erotusmenetelmän toimintaperiaate on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. Käänteisen elektrodialyysin toimintaperiaate voihapon erottamiseksi fermentointiliuoksesta [20, s. 7].

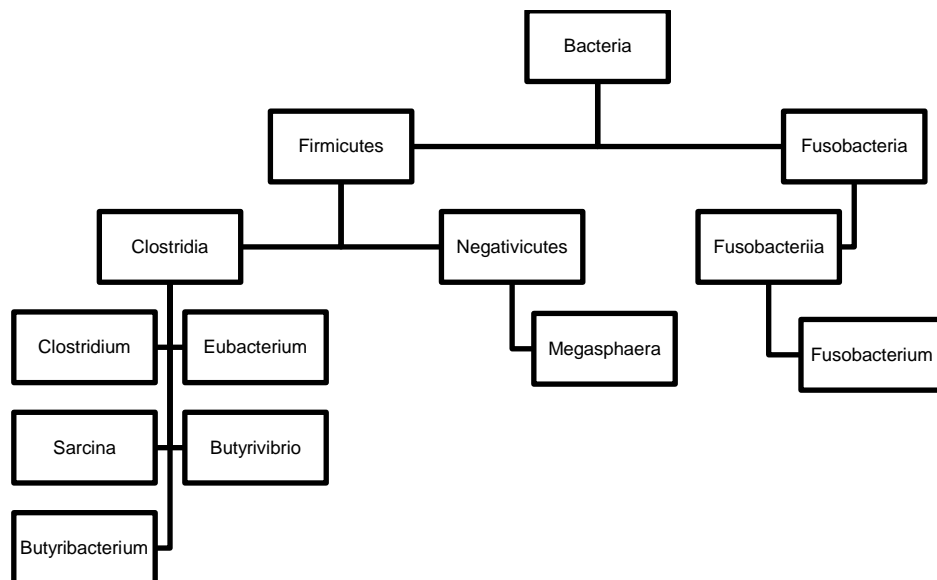
Kun bioreaktorista ulos tuleva liuos virtaa REED-yksikköön, voihapon anionit ($\text{C}_3\text{H}_7\text{COO}^-$) siirtyvät anionikalvon läpi erottuen samalla fermentointiliuoksesta. Kalvon toisella puolella virtaavasta natriumhydroksidiliuoksesta (NaOH) irtoavat Na^+ -ionit yhdistyvät voihapon anionien kanssa muodostaen suolaa ($\text{C}_3\text{H}_7\text{COONa}$), joka virratessaan EDBM-yksikköön (electrodialysis with bipolar membrane) regeneroituu natriumhydroksidiksi ja vapauttaa voihappoa sisältävän vesiliuoksen. [20, s. 6–7.]

Muita potentiaalisia erotusmenetelmiä ovat muun muassa uuttaminen liuottimilla, käänteisosmoosi ja nanosuodatus. Erotusmenetelmän valintaan vaikuttaa erotustehokkuuden lisäksi sen operointikustannukset ja tuotteiden käyttötarkoitus. Haasteena on löytää kustannustehokas erotusmenetelmä, jonka avulla päästään maksimaalisiin erotustehokkuuksiin minimaalisilla kustannuksilla. Tuotteiden käyttötarkoitus sanelee tarvittavan laadun. Mikäli edullisemmalla erotusmenetelmällä saadaan tuotettua kyseiseen käyttötarkoitukseen riittävän puhdasta happoa, ei ole järkevää käyttää kalliimpaa erotusmenetelmää. [12, s. 780–783.]

3 Voihappo bakteerien aineenvaihduntatuotteena

3.1 Voihapon tuottajabakteerit

Useiden anaerobisten bakteerien tiedetään tuottavan aineenvaihduntatuotteenaan voi-happoa. Voihappoa tuottavia bakteerikantoja on eristetty esimerkiksi jätevedestä, veden-puhdistuksessa syntyvästä lietteestä, maaperästä, saastuneesta maidosta ja muista elintarvikkeista sekä suolistosta. [21, s. 153.] Tällä hetkellä tutkimus on keskittynyt seu-raaviin bakteerisukuihin: *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Butyribacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Megasphaera* ja *Sarcina* [22, s. 657]. Suurin osa edellä mainituista bak-teerisuvuista kuuluu firmikuuttien (*Firmicutes*) pääjaksoon pois lukien *Fusobacterium* (kuva 3) [23].



Kuva 3. Monet tämän hetken tutkituimmista voihapon tuottajabakteereista kuuluvat firmikuutteihin (*Firmicutes*), joka on yksi bakteerien pääjaksoista [23].

Erityisesti *Clostridium*-suvun bakteereita on tutkittu viime vuosina voihapon tuotannossa niiden korkean tuottavuuden ja kestävyysden vuoksi. *Clostridium butyricum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium populeti* ja *Clostridium thermobutyricum* ovat kaikki grampositiivisia, anaerobeja ja itiöitä muodostavia bakteereja. Ne viihtyvät pääasiassa 35–37 °C:ssa (*C. thermobutyricum* 55 °C:ssa) ja pystyvät hyödyntämään useita eri hiilenlähteitä. [21, s. 154.]

Clostridium-suvun lisäksi *Megasphaera*-sukuun kuuluu useita potentiaalisia bakteerilajeja, joita voisi hyödyntää voihapon tuotannossa. *Megasphaera elsdenii*, *Megasphaera cerevisiae*, *Megasphaera micronuciformis*, *Megasphaera paucivorans* ja *Megasphaera sueciensis* tunnetaan oluenpilaajabakteereina, sillä niitä esiintyy erityisesti oluessa ja panimoympäristössä. Ne ovat ehdottomia anaerobeja, gram-negatiivisia kokkeja ja kykenemättömiä liikkumaan tai muodostamaan itiöitä. Niiden on mahdollista kasvaa 15–37 °C:n lämpötilassa (optimaalisena lämpötilana pidetään 28 °C:ta). Optimaaliset kasvuolosuhteet vaihtelevat bakteerilajin mukaan. *M. cerevisiae* -lajin kohdalla alhainen pH (4,1) ja korkea etanolipitoisuus (<2,1 til.-%) inhiboivat kasvua. Tästä johtuen sitä tavataan matala-alkoholipitoisista, pastöroimattomista oluista, joissa sen aineenvaihduntatuotteet (voi-, etikka-, valeriaana-, ja kapronihappo sekä asetoini ja rikkivety) aiheuttavat olueen epämiellyttäviä aromeja. [24, s. 202–203.] Myös hapensietokyky vaihtelee anaerobisten bakteerien välillä [25 s. 306]. Erityisesti teollisessa mittakaavassa prosessin hallinnan kannalta on parempi, mikäli käytetty organismi sietää pieniä määriä happea. Tällöin organismin käsittely helpottuu prosessin aikana.

Suurin osa tutkituista *Megasphaera*-suvun bakteerilajeista on valikoivia hiilenlähteiden suhteen. Esimerkiksi *M. cerevisiae* kelpuuttaa ravinnoksi vain fruktoosin, arabinoosin, laktaatin tai glukonaatin. [26, s. 2116.] Käytettävä hiilenlähde vaikuttaa syntyvien aineenvaihduntatuotteiden jakaumaan. Orgaanisista hapoista voi- ja kapronihappoa muodostuu eniten fruktoosista, kun taas valeriaanahappo on pääasiallinen aineenvaihduntatuote, kun hiilenlähteenä toimii laktaatti eli maitohappo (taulukko 1). [27, s. 126.] Hyödyntämällä useampaa kuin yhtä kantaa fermentoinnissa laajennetaan potentiaalisten hiilenlähteiden määrää. Tämän seurauksena voidaan käyttää erilaisia jätevirtoja puhtaan glukooosin tai fruktoosin sijaan, mikä johtaa parempaan taloudelliseen tuottavuuteen. [3, s. 373.]

Taulukko 1. *M. cerevisiae* -kannan aineenvaihduntatuotteiden jakautuminen fruktoosilla ja laktaatilla [27, s. 126].

Aineenvaihduntatuotteet (mmol per mmol substraattia)							
<i>M. cerevisiae</i>	Etikka-happo	Propioni-happo	Voi-happo	Valeriaani-happo	Kaproni-happo	H ₂	CO ₂
<i>Fruktoosi</i>	0,10	0,07	0,27	0,17	0,24	0,38	0,65
<i>Laktaatti</i>	0,15	0,11	0,17	0,42	0,03	0,04	0,22

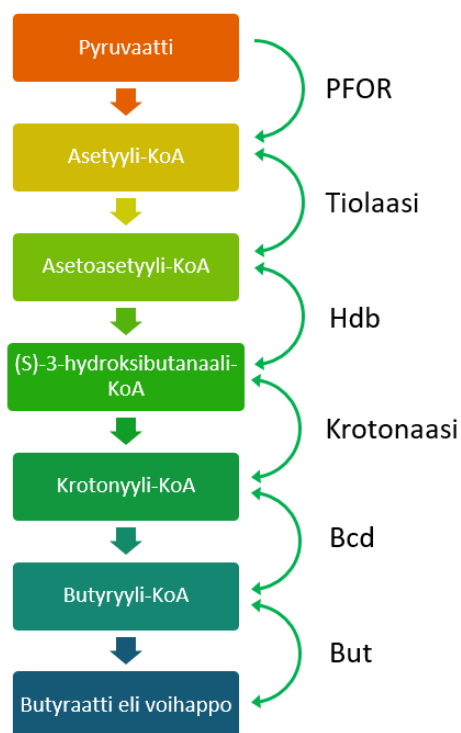
3.2 Yhteisviljely voihapsen tuotannossa

Tällä hetkellä erilaisia kemikaaleja tuotetaan bioteknologiaa hyödyntäen yli miljardien eurojen arvosta joka vuosi. Suurin osa näistä valmistetaan steriileissä olosuhteissa yksittäisellä bakteerikannalla. Kun fermentointi perustuu yhteen tarkoin valittuun bakteerikantaan ja sen aineenvaihduntareitit ovat tunnettuja, prosessin hallitseminen on helppoa. Tutkimus on kuitenkin osoittanut, että joissain tapauksissa yhteis- ja sekaviljelmien käyttäminen tulisi prosessin kannalta edullisemmaksi. Tämä perustuu eri bakteerikantojen kykyyn hyödyntää samanaikaisesti samoja aineenvaihduntareittejä. Luonnossa suurin osa biokonversioista perustuu useiden mikro-organismien yhdenaikaiseen aineenvaihduntaan. Yksi hyvä esimerkki on nisäkkäiden suolisto, jossa yli 500 bakteerikantaa on vuorovaikutuksessa keskenään. Bakteerikantojen aineenvaihduntareitit ovat yhteydessä toisiinsa ja muodostavat hyvin monimutkaisen kuvion yhteisten substraattien ja aineenvaihduntatuotteiden seurauksena. [3, s. 371.]

Teollisuudessa bakteerikantojen välistä yhteistyötä hyödynnetään melko vähän, mutta se on vakiinnuttanut asemansa esimerkiksi jäteveden puhdistuksessa, biokaasun tuotannossa ja joidenkin perinteisesti valmistettavien ruokien kuten juuston, jogurtin, hapantaikinan ja viinin valmistuksessa. Fermentointiprosessissa voidaan käyttää kahden tunnetun kannan yhteisviljelyä tai useamman määrittelemättömän kannan sekaviljelyä. Yhteis- ja sekaviljelmien hallinta on haastavampaa kuin yksittäisten kantojen, sillä esimerkiksi kun asidogeeniset bakteerit tuottavat orgaanisia happoja kuten voihapsa, fermentointiliuoksen pH laskee. Tämä saattaa haitata muiden organismien kasvua ja aineenvaihduntaa. Toisaalta on myös mahdollista, että prosessissa käytetyt kannat elävät symbioosissa, jolloin tuotteiden saanto ja laatu paranevat. Joissain tapauksissa yhteisviljelyllä saadaan tuotettua myös sellaisia tuotteita, joita ei yksittäisten kantojen viljelyllä ole mahdollista tuottaa. Arvokemikaalien tuottaminen biologisesti hyödyntäen uusiutuvia luonnonvaroja kasvattaa merkitystään. Yhteis- ja sekaviljelyllä voi olla suuri rooli biopohjaisten tuotteiden valmistuksen kehityksessä. [3, s. 371–373.]

3.3 Voihapon tuottomekanismit

Bakteerit voivat tuottaa voihaptoa neljää eri aineenvaihduntareittiä pitkin. Näiden nimet ovat asetyyli-koA-reitti, glutaarihapo-reitti, lysiini-reitti ja 4-aminobutaanihapto-reitti. Kolmessa jälkimmäisessä aineenvaihduntareitissä substraattina toimivat aminohapot ja ne ovat huomattavasti harvinaisempia kuin asetyyli-koA-reitti, joka on bakteerien pääasiallinen aineenvaihduntareitti voihapon tuottamiseksi. Tässä aineenvaihduntareitissä voihaptoa tuotetaan muuttamalla substraattina toimiva hiilenlähde kuten glukoosi tai fruktoosi ensin pyruvaatiksi, joka muuntuu edelleen asetyyli-KoA:ksi (kuva 4). [28, s. 1–2.]



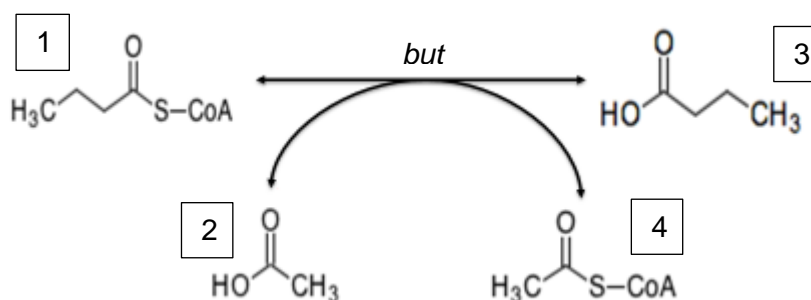
Kuva 4. Hypoteettinen ja yksinkertaistettu kaavio pyruvaatin muuttamisesta voihapoksi asetyyli-KoA-reittiä pitkin. Entsyymit: *PFOR* eli pyruvaatti-ferredoksiini-oksidoreduktaasi; *tiolaasi*; *hdb* eli hydroksibutyryyli-koA dehydrogenaasi; *krotonaasi*; *bcd* eli butyryyli-koA-dehydrogenaasi ja *but* eli butyryyli-koA: asetaatti-koA transferaasi. [28, s. 2.]

Kun hiilenlähteenä toimii glukoosi tai fruktoosi, se muutetaan pyruvaatiksi Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) -reitin kautta [4, s. 2]. Tätä kymmenen entsyymikatalysoidun reaktion sarjaa kutsutaan glykolyysiksi. Viisi ensimmäistä entsyymiä osallistuvat niin sanottuun valmistelemaan vaiheeseen, jossa ATP:n (adenosiinitrifosfaatin) avulla muutetaan

glukoosia glyseraldehydi-3-fosfaatiksi ($C_3H_7O_6P$). Toisessa vaiheessa loput viisi entsyymiä osallistuvat reaktioihin, joiden tarkoituksena on muuttaa glyseraldehydi-3-fosfaatti pyruvaatiksi. Samalla muodostuu jokaista glukoosimolekyyliä kohden kaksi molekyyliä ATP:ta ja NADH:ta (nikotiinihappoamidiadeniinidinukleotidifosfaattia). [29, s. 793–794.] NADH toimii pelkistimenä aineenvaihdunnan välituotteissa [30, s. 2]. Vaihtoehtoisesti mikäli substraattina toimii laktaatti eli maitohappo, se muutetaan pyruvaatiksi laktaattidehydrogenaasin toimesta. Tämä reaktio toimii myös toiseen suuntaan ja osa bakteereista voi muuttaa pyruvaattia laktaatiksi. [4, s. 2.]

Seuraavaksi glykolyysissa syntyneestä pyruvaatista muodostuu asetyylikoentsyymi A:ta (asetyyli-KoA) sekä hiilidioksidia reaktioiden sarjassa, joiden katalysaattorina toimii pyruvaatti-ferredoksiini-oksidoreduktaasi (PFOR). Anaerobeilla kahdesta moolista pyruvaattia muodostuu kaksi moolia hiilidioksidia, jotka pelkistyvät muodostaen moolin asetyyli-KoA:ta (Wood-Ljungdahl reitti). [31, s. 28494.] Asetyyli-KoA voidaan tämän jälkeen muuttaa butyryyli-KoA:ksi neljän reaktion sarjassa, joissa välituotteina toimivat asetoasetyyli-KoA, 3-hydroksibutanaali-KoA ja krotonyyli-KoA. Krotonyyli-KoA on eräänlainen yhdistelmäkohta myös muille mahdollisille aineenvaihduntareiteille voihapon tuottamiseksi, sillä aminohappoihin pohjautuvat glutaarihappo-reitti, lysiini-reitti ja 4-aminobutaanihappo-reitti yhtyvät tässä kohti asetyyli-KoA-reittiin. Krotonyyli-KoA muuttuu butyryyli-KoA:ksi butyryyli-koA-dehydrogenaasin (bcd) katalysoimassa reaktiossa. [28, s. 2.]

Viimeinen vaihe butyryyli-KoA:sta voihapoksi voi kulkea kahta eri reittiä. Vaihtoehdot ovat butyryyli-koA:asetatti-koA-transferaasin (but) tai butyraattikinaasin (buk) katalysoima reaktio. Käytetty reitti vaihtelee bakteerilajin mukaan ja sitä käytetäänkin yhtenä keinoa tunnistaa voihapontuottaja kantoja. Osalla bakteerilajeista on mahdollisuus käyttää molempia reittejä hyväkseen. [28, s. 2.] *Megasphaera*-suvun bakteereista esimerkiksi *M. elsdenii* ja *M. microniformis* käyttävät *but*-reittiä voihapon tuottamiseksi. [28, s. 2; 32.] Tässä aineenvaihduntareaktiossa käytetään butyryyli-KoA:n lisäksi asetaattia eli etikkahappoa voihapon (ja asetyyli-KoA:n) valmistamiseen [32].



Kuva 5. Viimeisessä vaiheessa butyryyli-KoA:sta (1) ja asetaatista (2) muodostuu butyryyli-KoA:asetatti-KoA-transferaansin (*but*) avustuksella voi happoa (3) ja asetyyli-KoA:ta (4) [32].

Monet bakteerilajit tuottavat siis voi hapon lisäksi etikkahappoa ja muita orgaanisia happoja sekä vetyä ja hiilidioksidia. Bakteerilajin lisäksi olosuhteet sekä tarjolla olevat hiilenlähteet vaikuttavat siihen, missä suhteessa lopputuotteita muodostuu. [4, s. 2–4.] Osa bakteereista voi tuottaa fermentointiprosessissa myös asetonia, butanolia ja etanolia. Tässä niin kutsutussa ABE-fermentoinnissa etikka- ja voi happoa voidaan hyödyntää aineenvaihdunnan välituotteina. [33, s. 8–10.] *But*- ja *buk*-entsyymit katalysoivat aineenvaihduntareaktioita molempiin suuntiin eli niillä on kyky myös hajottaa voi happoa butyryyli-KoA:ksi. Tämän lisäksi myös butyryyli-KoA-ligaasin katalysoimassa reaktiossa voi haposta muodostuu butyryyli-KoA:ta. Tämä reaktio kuluttaa ATP:ta ja toimii vain yhteen suuntaan. [32.]

Joissain tapauksissa bakteerit voivat tuottaa voi happoa myös ketjuttamalla olemassa olevia substraatteja. Esimerkiksi *Megasphaera elsdenii* voi muodostaa maito- ja etikkahaposta ketjuttamalla voi happoa. Kyseessä on käänteinen β -hapetusreaktio, jossa vetyatomi toimii elektronin luovuttajana ja voi hapon lisäksi muodostuu hiilidioksidia (CO_2) ja vettä. Käänteiset β -hapetusreaktiot ovat reversiibeilejä, eli ne voivat tapahtua myös päinvastaiseen suuntaan riippuen kasvatuksen olosuhteista. Vedyn lisäksi myös etanoli voi toimia elektronin luovuttajana, jolloin voi happoa voidaan muodostaa ketjuttamalla etanolia ja etikkahappoa. Mikäli ketjutetaan voi happoa etanolin kanssa, muodostuu kapronihappoa. [34, s. 117–118.]

4 Materiaalit ja menetelmät

4.1 Yleistä

Tämän insinöörityön kokeellisessa osassa seulottiin yhteisviljelyyn sopia bakteerikantoja VTT:n kantakokoelmasta ja pyrittiin tehostamaan voihapsen tuotantoa optimoimalla fermentointiprosessissa käytettyjä parametreja. Fermentoinneissa käytetyt kasvatusalustat valmistettiin hyödyntäen elintarviketeollisuudessa syntyviä sivuvirtoja kuten lanttua tai kaalia, jotka oli hylätty niiden koon tai muodon vuoksi myyntiin kelpaamattomina. Kasvatukset toteutettiin pullo- ja bioreaktoritilavuuksissa aseptisesti yksittäisillä kannoilla sekä kahden seulotun kannan yhteisviljelynä. Yhteisviljelyn tarkoituksena oli laajentaa hiilenlähteeksi kelpaavien substraattien määrää ja hyödyntää bakteerikantojen ristikkäisiä aineenvaihduntareittejä voihapsen tuotannossa.

4.2 Bakteerikannat

Voihapsen tuottajakannat *Megasphaera cerevisiae* VTT E-84195, *Megasphaera cerevisiae* VTT E-981087 ja *Intestinimonas butyriciproducens* SA283a sekä laktaatin tuottajakannat *Pediococcus pentosaceus* VTT E-153483 ja *Pediococcus pentosaceus* VTT E-022174 saatiin tätä tutkimusta varten VTT:n kantakokoelmasta. Kaikki tutkimuksessa käytetyt kannat olivat luonnollisia kantoja, eikä tutkimuksessa käytetty geenimuunneltuja kantoja.

4.3 Kasvatusolosuhteiden valintaprosessi

Tutkimukseen valittuja kantoja varastoitettiin -80 °C:n lämpötilassa jäisinä varastoviljelminä ja niitä siirrostettiin kolmelle eri nestemäiselle kasvatusalustalle, jotta selviäisi, millä alustoilla kunkin kannan kasvattaminen on ylipäättään mahdollista. Kasvatukset toteutettiin koeputkissa ja alustan tilavuus oli 5 ml. Alukasvatusten tarkoituksena oli löytää yhtenäinen kasvatusalusta kaikille viidelle kannalle, jotta myös kahden kannan yhteisviljely olisi mahdollista. Kokeessa käytetyt kasvatusalustat valittiin sillä perusteella, että ne olivat kirjallisuuden mukaan kullekin kannalle optimaalisia kasvatusalustoja.

M. cerevisiae -kantoja kasvatettiin PYF- ja RCM-kasvatusalustoilla sekä RCM-kasvatusalustalla, johon oli lisätty fruktoosia (1,25 til.-%). *I. butyriciproducens* -kantaa kasvatettiin RCM-, MRS- ja PYF-kasvatusalustoilla ja *P. pentosaceus* -kantoja kasvatettiin MRS- ja RCM-kasvatusalustoilla. Kasvatusalustojen tarkempi koostumus on esitelty liitteessä 2. Kasvatustilämpötila oli 30 °C tai 37 °C ja kasvua seurattiin silmämääräisesti sameutta arvioiden kolmen vuorokauden ajan (taulukko 2). *M. cerevisiae* -kantoja ja *I. butyriciproducens* -kantoja kasvatettiin anaerobisesti ja *P. pentosaceus* -kantoja sekä anaerobisesti että aerobisesti.

Taulukko 2. Potentiaalisten kasvuolosuhteiden arviointi. Alustojen koostumus on esitetty liitteessä 2. AE = aerobinen kasvatus, AN = anaerobinen kasvatus. Kasvua arvioitiin silmämääräisesti sameuden perusteella kolmeportaisella asteikolla: kirkas, hie-man sameutta, melko samea, erittäin samea (-/+ /++ /+++).

Kanta	Alusta	Lämpötila (°C)	Happi	Kasvu 1 vrk	Kasvu 2 vrk	Kasvu 3 vrk
<i>Megasphaera cerevisiae</i> E-84195	PYF	30	AN	-	+	+
	PYF	37	AN	-	-	-
	RCM	30	AN	++	++	++
	RCM	37	AN	+	+	++
	RCM + 1,25 % fruktoosia	30	AN	+	+++	+++
	RCM + 1,25 % fruktoosia	37	AN	-	++	+++
<i>Megasphaera cerevisiae</i> E-981087	PYF	30	AN	++	++	++
	PYF	37	AN	-	+	++
	RCM	30	AN	++	++	++
	RCM	37	AN	+	+	+
	RCM + 1,25 % fruktoosia	30	AN	++	++	+++
	RCM + 1,25 % fruktoosia	37	AN	-	+	++
<i>Pediococcus pentosaceus</i> E-153483	MRS	37	AE	++	+++	+++
	MRS	37	AN	+	++	+++
	RCM	37	AE	++	++	++
	RCM	37	AN	-	+	++
<i>Pediococcus pentosaceus</i> E-022174	MRS	37	AE	++	+++	+++
	MRS	37	AN	-	++	+++
	RCM	37	AE	+	++	++
	RCM	37	AN	+	+	++
<i>Intestinimonas butyriciproducens</i> SA283a	RCM	37	AN	+	++	++
	PYF	30	AN	-	+	+
	MRS	37	AE	-	-	-

4.4 Bakteerikantojen voihapsen sietokyvyn testaaminen

Bakteerikantojen voihapsen sietokykyä testattiin nestemäisellä RCM-kasvatusalustalla (Reinforced Clostridial Medium), sillä kaikki tutkitut kannat pystyivät kasvamaan sen sisältämien ravinteiden avulla. Prosessissa hyödynnettävien kantojen tulisi kestää voihapsen riittävän suuria pitoisuuksia, jotta kasvu ei hidastuisi tai pysähtyisi, kun voihapsen muodostuu bakteerien aineenvaihduntatuotteena. Kokeessa tutkittiin bakteerien kasvua kolmessa eri voihapsenpitoisuudessa lisäämällä RCM-kasvatusalustaan haluttu määrä puhdasta voihapsen (>99 %, Merck KGaA, Darmstadt, Saksa). Tutkittavat voihapsenpitoisuudet olivat seuraavat:

- ei lisättyä voihapsen
- 2,5 g/l lisättyä voihapsen
- 5,0 g/l lisättyä voihapsen.

Kasvatukset toteutettiin pullokasvatuksina (20 ml). *M. cerevisiae* -kantoja kasvatettiin 30 °C:ssa anaerobisesti, *I. butyriciproducens* -kantoja 37 °C:ssa anaerobisesti ja *P. pentosaceus* -kantoja sekä aerobisesti että anaerobisesti 37 °C:ssa. Puskureiksi valittiin 100 mM asetaattipuskuri sekä 100 mM fosfaattipuskuri ja niiden toimivuutta vertailtiin edellä mainituilla voihapsenpitoisuuksilla pullokasvatuksissa.

4.5 Sivuvirtojen esikäsittely

Tässä tutkimuksessa tarkasteltavat elintarviketeollisuuden sivuvirrat olivat lanttu (Bama Industri As, Norja), kaali (Vaissi Oy, Suomi), mäski (Fat Lizard Brewing Company Oy, Suomi) ja omena (VTT Oy). Tutkimuksessa hyödynnetyt kaalinlehdet olivat ylijäämää kaalikäärleiden valmistusprosessista. Lantut oli hylätty myyntiinkelpaamattomana niiden koon tai muodon vuoksi. Mäskiä taas syntyy väistämättä oluen valmistusprosessissa ja omenaa mätäneen syksyisin puihin, sillä tarjonta ylittää kysynnän. Omena nousi potentiaalisesti sivuvirraksi vasta tutkimuksen edetessä sen muita tutkittuja sivuvirtoja korkeamman fruktoosipitoisuuden vuoksi. Tästä syystä tutkimuksessa käytettiin tutkimushetkellä saatavilla olevaa italialaista luomuomenaa (Gala). Esikäsittely vaihteli sivuvirran mukaan. Lanttu oli esikäsitelty jo etukäteen ja Norwegian Institute of Bioeconomy Research -tutkimuslaitos toimitti sen pyreeksi prosessoituna VTT:lle.

4.5.1 Kaalin ja omenan esikäsittely

Kaali ja omena esikäsiteltiin samalla tapaa Witt Juicepresso WJPW-1 -mehupuristimella (Witt Hvidevarer A/S, Herning, Tanska) puristamalla raaka-aine kahdeksi jakeeksi: mehuksi ja massaksi (kuva 6). Puristamisessa syntyneet jakeet yhdistettiin samassa suhteessa kuin niitä oli alkuperäisestä raaka-aineesta muodostunut. Tällä tavoin esikäsitellyn sivuvirran ravintoainesisältö ei juurikaan poikennut alkuperäisestä raaka-aineesta. Yhdistämällä jokaisesta puristuserästä muodostuneet mehu- ja massajakeet toisiinsa hävikkiä ei käytännössä syntynyt kaalin ja omenan esikäsittelystä.



Kuva 6. Kaalin ja omenan esikäsittely tapahtui mehupuristimella.

4.5.2 Mäskin esikäsittely

Mäskin esikäsittely tapahtui entsyymihydrolyysin avulla. Tämän tarkoituksena oli vapauttaa käymiskelpoisia sokereita bakteerien käyttöön. Ensiksi määritettiin mäskin kuiva-ainepitoisuus. Tämä tapahtui pesemällä mäskiä pienellä määrällä laboratoriovettä imusuodatuksessa. Imusuodatus tapahtui Büchner-suppilolla ja sen tarkoituksena oli saada ylimääräinen vesi irti mäskistä. Pesun jälkeen mäskiä kuivattiin 105 °C:ssa, kunnes sen massa ei enää muuttunut. Kuivatun mäskin massaa verrattiin sen massaan ennen kuivausta, jolloin keskimääriseksi kuiva-aineprosentiksi saatiin noin 23 %. Kuiva-ainemääritys tehtiin triplikaatteina.

Mäskin entsyymihydrolyysi toteutettiin 10 %:n ja 15 %:n kuiva-ainepitoisuuksilla. Puskurina käytettiin 100 mM:sta asetaattipuskuria ja pH asetettiin kuuteen, sillä se oli optimaalinen hydrolyysissä käytetyille kaupallisille entsyymeille (Novozymes, Bagsværd, Tanska), jotka olivat Protamex® (20 mg per g kuiva-ainetta) ja Cellic® CTec2 (10 mg per g kuiva-ainetta). Protamex® on sekoitus proteaasientsyymejä, joiden tehtävänä on pilkkoa proteiineja aminohapoiksi. Cellic® CTec2 on sekoitus sellulaaseja, β -glukosidaaseja ja hemisellulaaseja, jotka pilkkovat hydrolysoitavan materiaalin sisältämää selluloosaa, hemiselluloosaa ja ligniiniä vapaiksi sokereiksi. Hydrolyysi tehtiin 500 ml:n Erlenmeyer-pulloissa, vaikka itse mäskin ja puskurin tilavuus oli yhteensä 50 ml:aa, jotta sekoituspinta-alaa olisi riittävästi. Mäskiä hydrolysoitiin ravistelijassa (200 rpm) vuorokauden ajan 50 °C:ssa.

4.6 Sivuvirta-RCM-kasvatusalustojen valmistus

Esikäsiteltyjen sivuvirtojen monosakkaridipitoisuudet analysoitiin nestekromatografisesti (Dionex ICS-3000, CarboPac PA1 kolumni, Thermo Scientific, Kalifornia, Yhdysvallat) ja kasvatusalustat valmistettiin lisäämällä valittua sivuvirtaa modifioituun RCM-kasvatusalustaan (liite 2), siten että alustan sokeripitoisuus saatiin halutulle tasolle (kuva 7).



Kuva 7. Sivuvirtakasvatusalustat valmistettiin lisäämällä haluttua sivuvirtaa modifioituun RCM-kasvatusalustaan. Koska modifioitu RCM ei sisältänyt sokeria, sivuvirta-alustojen sisältämät sokerit olivat peräisin vain sivuvirrasta.

Koska entsyymihydrolysoituneen mäskin glukoosipitoisuudet olivat erittäin alhaisia (keskimäärin 2,5 g/l, tulokset esitetty luvussa 5.2.3), siitä valmistettiin kasvatusalustat siten,

että sokerittomasta RCM-kasvatusalustasta tehtiin kymmenkertainen varastoliuos, jota sitten yhdistettiin mäskin kanssa suhteessa 1:10. Tällä tavoin minimoitiin glukoosipitoisuuden laimeneminen entisestään. Kasvatuksia sivuvirta-alustoilla tehtiin ilman puskuria sekä asetaattipuskurin tai piperatsiini-N,N'-bis-2-etaani-sulfonihappo (PIPES) -puskurin kanssa. Koska käytetty puskuri ja alustan sokeripitoisuus vaihtelivat, nämä tiedot on ilmoitettu erikseen kunkin kasvatuskokeen tulosten yhteydessä.

4.7 Minimaalialustan valmistus

Minimaalialusta koostui omenamehusta, vitamiini- ja mineraaliliuoksista sekä 20 mM:sta PIPES-puskurista. Minimaalialustaa varten valmistettiin tarvittavat liuokset erillisissä astioissa. Liuosten tarkempi sisältö on kuvattu liitteessä 2. Kaikkien liuosten pH:ksi säädettiin 6,8, jonka jälkeen ne steriloitiin suodattamalla. Mineraaliliuos valmistettiin ilman kalsiumkloridia (CaCl_2), jotta vältettiin liuoksen sakkautuminen. Kalsiumkloridista valmistettiin erillinen varastoliuos (100 g/l), jota lisättiin alustaan lopuksi tarvittava määrä. Kymmenkertainen vitamiiniliuos valmistettiin kasvatuksia edeltävänä päivänä ja säilytettiin jääkaapissa (4 °C) valolta suojattuna.

4.8 Pullo- ja bioreaktorikasvatukset

Pullo- ja bioreaktorikasvatuksissa käytettiin kahta bakteerikantaa, jotka olivat *M. cerevisiae* E-981087 ja *P. pentosaceus* E-153483. Osa kasvatuksista tehtiin valittujen kantojen yhteisviljelynä. Alustana käytettiin 100 mM asetaattipuskuroitua RCM-kasvatusalustaa tai sivuvirta-RCM-kasvatusalustaa, jonka valmistus on esitelty luvussa 4.5. Bakteerikantojen esikasvatus tapahtui siirrostaamalla jäisestä varastoviljelmästä nuppineulanpään kokoinen siirrostel RCM-kasvatusalustaan (5 ml). Inkubointiaika oli kolme vuorokautta, jonka jälkeen tarvittaessa esikasvatuksesta siirrettiin uusi siirrostel (3,0 til-%) suurempaan tilavuuteen.

4.8.1 Inokulaatin tilavuuden määrittäminen

Ennen siirrostusta lopulliseen kasvatusalustaan, esikasvatusten sameus mitattiin spektrofotometrisesti aallonpituudella 630 nm. Saatujen absorbanssien perusteella laskettiin tarvittavan esikasvatuksen tilavuus siten, että kasvatusten aloitusabsorbanssiksi saatiin 0,1. Laskemisessa hyödynnettiin kaavaa, $c_1 V_1 = c_2 V_2$, jossa c_1 on mitattu absorbanssi, c_2 on tavoiteltu absorbanssi, V_1 on esikasvatuksesta otettava tilavuus, ja V_2 on kasvatuksen kokonaistilavuus.

4.8.2 Pullokasvatusten olosuhteet

Anaerobisia esi- ja pullokasvatuksia käsiteltiin anaerobikaapissa ja inkuboitiin joko anaerobikaapissa tai kasvatuspytöissä. Kasvatuspytöihin luotiin anaerobinen olotila pumpaamalla niihin seoskaasua Anoxomat® -laitteiston (Advanced Instruments, Massachusetts, Yhdysvallat) avulla. Seoskaasu koostui vedystä (10 %), typestä (85 %) ja hiilidioksidista (5 %). Aerobisia kasvatuksia käsiteltiin laminaarikaapissa. Pullokasvatusten kasvatusolosuhteet olivat seuraavat:

- kasvatusalustan tilavuus 50 ml
- kasvatuslämpötila 30 °C (anaerobiset) tai 37 °C (aerobiset)
- inkubointiaika 72–96 tuntia
- kasvatusalustan pH ~6.5 (ei pH-säätelyä)
- näytteenotto 24. tunnin välein
- näytetilavuus 1–2 ml.

4.8.3 Bioreaktoriolosuhteet

Fermentoinnit tehtiin Multifors 2 -pöytäbioreaktoreilla (Infors AG, Bottmingen, Sveitsi) seuraavissa kasvatusolosuhteissa:

- kasvatusalustan tilavuus 300–400 ml
- anaerobinen

- kasvatuslämpötila 30 °C
- inkubointiaika 3–5 vuorokautta
- pH 5.5–6.0 (jatkuva pH-säätely)
- sekoitus 150 rpm
- näytteenotto 2–3 kertaa vuorokaudessa
- näytetilavuus 8–20 ml
- syöttönopeus 2,1–2,5 ml/t.

Anaerobiset olosuhteet luotiin syöttämällä bioreaktorien yläosaan typpeä (N_2) 0,2 l/min koko fermentoinnin ajan. pH asetettiin vastaamaan steriloidun kasvualustan pH:ta ja säätely tapahtui automaattisesti lisäämällä bioreaktoriin 1 M:sta natriumhydroksidia (NaOH) tai 15 %:sta fosforihappoa (H_3PO_4). pH- ja pO_2 -arvoja sekä ulostulokaasua tarkkailtiin jatkuvatoimisella mittauksella. Mittaamalla hiilidioksidin prosentuaalista osuutta ulostulokaasusta, voitiin seurata prosessin kulkua ja arvioida paras ajankohta syötön aloitukselle (liite 3, kuva 1). Tutkimuksessa testattiin sekä panos- että panos-syöttöfermentointimenetelmiä. Panos-syöttöfermentoinneissa syöttönä käytettiin valitun sivuvirran nestemäistä jaetta kuten kaali- tai omenamehua.

4.9 Analyttiset menetelmät

Pullo- ja fermentointinäytteistä mitattiin solumassan kasvua, pH:ta, substraattien kulu- tusta ja tuotteiden muodostumista. Bioreaktorissa oli lisäksi mahdollista seurata ulostu- lokaasusta hapen, hiilidioksidin ja typen prosentuaalisia mooliosuuksia.

4.9.1 Absorbanssi ja pH

Kasvua seurattiin kolmesta viiteen vuorokautta mittaamalla näytteiden pH:ta (Mettler To- ledon Seven2Go pro, Sveitsi) sekä absorbanssia (engl. optical density eli OD) (The Mul- tiskan EX microplate reader, Thermo Fisher Scientific, Yhdysvallat) aallonpituudella 630 nm. Ennen OD-arvon mittaamista näytteet homogenisoitiin käyttämällä Vortex® -sekoit- tajaa, jonka jälkeen 200 μ L näytettä (tai sopivassa suhteessa laimennettua näytettyä) pipetoitiin kuoppalevyille (kuva 8). Sivuvirta-kasvatuksia käsitellessä nopea sentrifugointi

(2000 rpm, 2–3 sekuntia) oli tarpeen ennen pipetointia, jotta tulos ei olisi vääristynyt siivertapartikkeleiden johdosta. Koska sentrifugoitaessa myös soluja mahdollisesti laskeutui astian pohjalle, huomioitiin tämä tulosten tarkastelussa.



Kuva 8. Bakteerien kasvua seurattiin mittaamalla kasvatusten sameutta spektrofotometrisesti.

4.9.2 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

Voi-, etikka- ja maitohappojen sekä glukoosin ja fruktoosin pitoisuuksia mitattiin korkean erotuskyvyn nestekromatografilla (High Performance Liquid Chromatography eli HPLC) (Waters Alliance 2695, Waters Corporation, Milford, USA). Mittausparametrit olivat

- HPX-87H-kolumni (Bio-Rad, München, Saksa)
- liikkuva faasi 5 mM rikkihappo nopeudella 0,3 ml/min
- 35 °C
- ultraviolettidetektorilla aallonpituudella 210 nm (Waters 2487, Waters Corporation, Milford, USA)
- taitekerroindetektorilla (Waters 410).

Voihappopitoisuutta analysoitiin UV-detektorilla ja muiden tutkittavien aineiden pitoisuuksia analysoitiin taitekerroindetektorilla. Näytteet valmistettiin sentrifugoimalla 2 ml kasvatusta Eppendorf® -putkessa 10 minuuttia nopeudella 14 000 rpm (Eppendorf® Refrigerated Microcentrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hampuri, Saksa). Kirkasta supernatanttia pipetoitiin 1 ml HPLC-näyteputkiin. Tarvittaessa sentrifugointi toistettiin puhtaassa Eppendorf® -putkessa, jotta HPLC-näyteputkiin päätyisi vain täysin kirkas neste.

4.9.3 Kaasukromatografia

Lyhyitä rasvahappoja (valeriaana-, kaproni-, etikka-, propaani- ja voihamppu) analysoitiin myös kaasukromatografilla (GC) (Agilent 7890A) seuraavin parametrein:

- massaselektiivinen detektori (MSD) (Agilent 5975C)
- kolumnit Agilent 160-2625-10 (25 m x 200 μ m x 0,3 μ m) ja Agilent 160-2625-10 (1,6 m x 150 μ m x 0 μ m) (Agilent Technologies, Kalifornia, USA)
- kantokaasuna helium nopeudella 1,2 ml/min
- näytteen injektointilavuus 1 μ l, liuottimen viiveaika 6 minuuttia
- kolumnien lämpötilat
 - i. 40 °C 1,5 minuuttia
 - ii. 160 °C nopeudella 10 °C/min
 - iii. 240 °C nopeudella 25 °C/min, viiveaika 3,3 minuuttia.

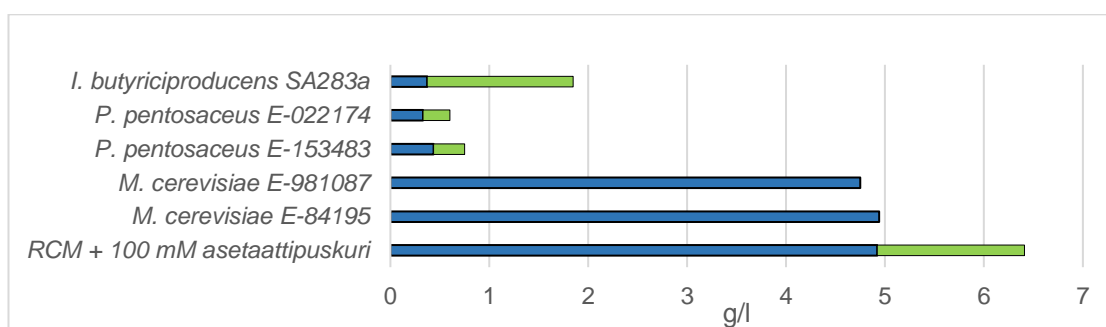
4.9.4 Massaspektrometria

Bioreaktorien ulostulokaasua analysoitiin linjassa olevalla QMG 421C -kvadrupoli massaspektrometrillä (Balzers Pfeiffer Scandinavia AB, Ruotsi) ja hapen, hiilidioksidin ja typen prosentuaaliset mooliosuudet laskettiin Balzers Quadstar 422 -ohjelmiston avulla. Tarkastelemalla ulostulokaasun hiilidioksidin osuutta oli mahdollista seurata reaaliajassa fermentointiprosessin kulkua ja näin ollen optimoida syötön aloitusta oikealla ajankohdalla. Hapen ja typen osuuksista nähtiin, että olosuhteet bioreaktoreissa pysyivät anaerobisina.

5 Tulokset

5.1 Bakterikantojen seulonta

Seulonnan tavoitteena oli valita yksi voihapsen tuottajakanta sekä yksi maitohapsen tuottajakanta yhteisviljelyyn sivuvirta-alustoilla, sillä yhteisviljely laajentaa hiilenlähteeksi kelpaavien substraattien määrää ja parantaa näin voihapsen saantoa. Kantojen seulonnassa käytetty RCM-kasvatusalusta sisälsi sekä glukoosia (5 g/l) että fruktoosia (1,5 g/l). Mittaamalla kasvatusten glukoosi- ja fruktoosipitoisuudet lopussa, ja vertaamalla arvoja kasvatusalustan pitoisuuksiin, vahvistettiin, että *Megasphaera cerevisiae* -kannat eivät pystyneet hyödyntämään glukoosia hiilenlähteenä (kuva 9). Vastavuoroisesti *Intestinimonas butyriciproducens* ei hyödyntänyt fruktoosia ainakaan silloin, kun glukoosia on tarjolla. *Pediococcus pentosaceus* -kannoille kelpasi sekä glukoosi että fruktoosi.

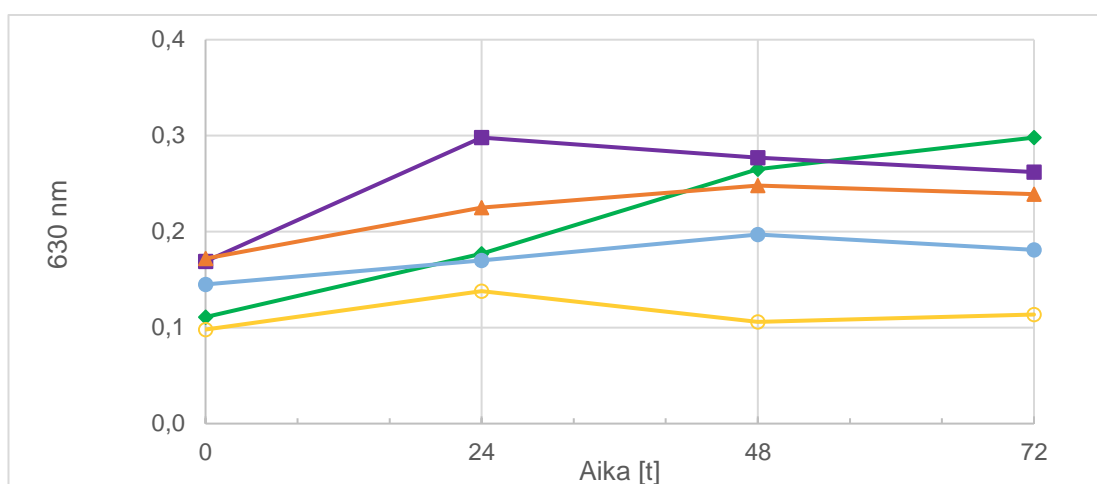


Kuva 9. Glukoosin (sininen) ja fruktoosin (vihreä) pitoisuudet pullokasvatusten (20 ml) loppupisteessä (72 h) viidellä eri bakterikannalla. Vertailuarvona käytetty 100 mM asetaattipuskuri RCM -kasvatusalustaa. Kasvatusolosuhteet: lämpötila 30 °C (*M. cerevisiae*) tai 37 °C (*P. pentosaceus* sekä *I. butyriciproducens*), anaerobinen kasvatus, ei sekoitusta.

Sama vertailu tehtiin myös kasvatusalustoilla, joihin oli lisätty voihapsa 2,5 g/l tai 5 g/l. Tässä tapauksessa sokerien kulutus (liite 4, kuva 1) sekä kasvun aiheuttama sameus kasvatusalustassa oli kauttaaltaan vähäisempää. Eri kasvatusalustojen substraattipitoisuudet kasvatuksen lopussa sekä bakterikantakohtaiset kasvukäyrät on esitetty liitteessä 4, kuvissa 2–6.

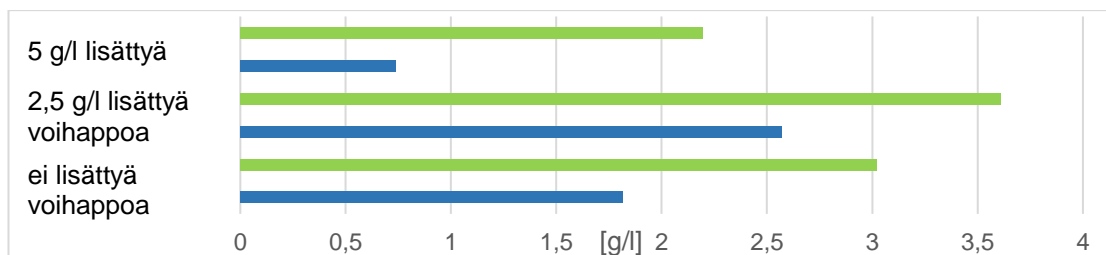
Bakterikantojen seulonnassa kasvatukset toteutettiin kahdella eri puskurilla, jotka olivat 100 mM asetaattipuskuri ja 100 mM fosfaattipuskuri. Kun alustaan lisättiin voihapsa

5 g/l, fosfaattipuskuri pystyi pitämään pH:n tasaisempana kuin asetaattipuskuri. Asetaattipuskuroidulla alustalla pH laski kuudesta viiteen, kun fosfaattipuskurilla vastaava luku oli noin 5,5. Suuremmasta pH:n laskusta huolimatta asetaattipuskuri näytti parantavan *M. cerevisiae* E-981087, *M. cerevisiae* E-153483 ja *I. butyriciproducens* SA283a -kantojen kasvua ja voihapsen tuottoa fosfaattipuskuria paremmin. *M. cerevisiae* -kannat kasvoivat kohtuullisen hyvin myös kasvatusalustoilla, joihin oli lisätty voihapsa. Sen sijaan, kun asetaattipuskuroituun RCM-kasvatusalustaan lisättiin voihapsa 5 g/l, *I. butyriciproducens* -kannan kasvu estyi käytännössä kokonaan (kuva 10). Maitohapon tuottajakannoista *P. pentosaceus* E-153483 kesti paremmin voihapsolisäyksen kuin *P. pentosaceus* E-022174.



Kuva 10. Viiden tutkimuksessa käytetyn bakteerikannan kasvukäyrät 100 mM asetaattipuskuroidulla RCM -kasvatusalustalla (20 ml), jossa lisättyä voihapsa 5 g/l. *P. pentosaceus* E-153483 (◆), *M. cerevisiae* E-981087 (■), *M. cerevisiae* E-84195 (▲), *P. pentosaceus* E-022174 (●), *I. butyriciproducens* SA283a (○). Kasvatusolosuhteet: lämpötila 30 °C (*M. cerevisiae*) tai 37 °C (*P. pentosaceus* sekä *I. butyriciproducens*), anaerobinen kasvatus, ei sekoitusta.

M. cerevisiae E-981087 tuotti suurempia pitoisuuksia voihapsa kuin *M. cerevisiae* E-84195 (kuva 11). Molemmilla kannoilla voihapsen tuotto näytti parantuvan, kun alustassa oli lähtötilanteessa voihapsa 2,5 g/l. *M. cerevisiae* E-84195 tuotti seulonnassa käytetyllä alustalla parhaimmillaan 2,6 g/l voihapsa, kun *M. cerevisiae* E-981087 -kannalla vastaava luku oli 3,6 g/l.

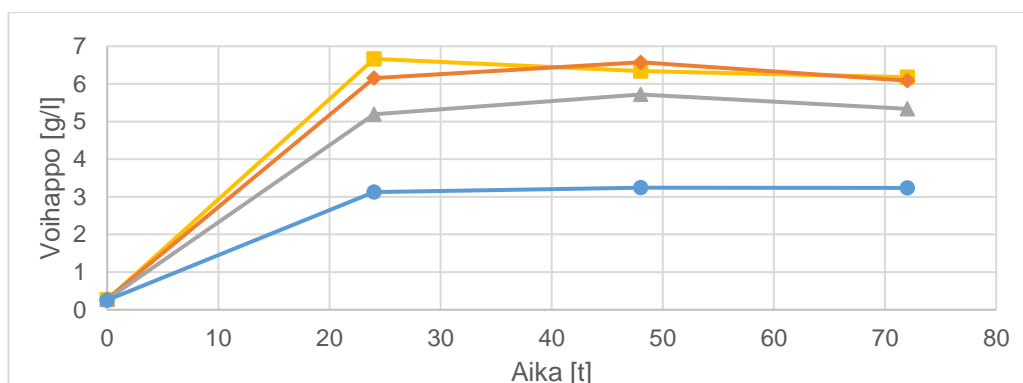


Kuva 11. *M. cerevisiae* E-84195 (sininen) ja *M. cerevisiae* E-981087 (vihreä) -kantojen tuottamat voihippopitoisuudet 72 tuntia inokulaatiosta. Kasvatusalustana käytettiin 100 mM asetaattipuskuroitua RCM -kasvatusalustaa kolmella eri voihippopitoisuudella. Kasvatusalustaan lisätty voihiappo (0, 2.5 tai 5 g/l) on vähennetty tuloksista.

5.2 Pullokasvatukset

5.2.1 Yhteisviljelyn toimivuus valituilla kannoilla

Pullokasvatukset toteutettiin seulonnan perusteella valittujen kantojen, *M. cerevisiae* E-981087 ja *P. pentosaceus* E-153483, kanssa. Yhteisviljelyssä kannat tuottivat suurempia määriä voihippoo kuin erillisviljelyssä (kuva 12). Myös fruktoosilisäys (5 g/l) sai aikaan korkeamman voihippopitoisuuden erityisesti *M. cerevisiae* -kannan erillisviljelyssä. Yhteisviljelyssä ero voihippopitoisuudessa alustojen välillä oli huomattavasti pienempi.

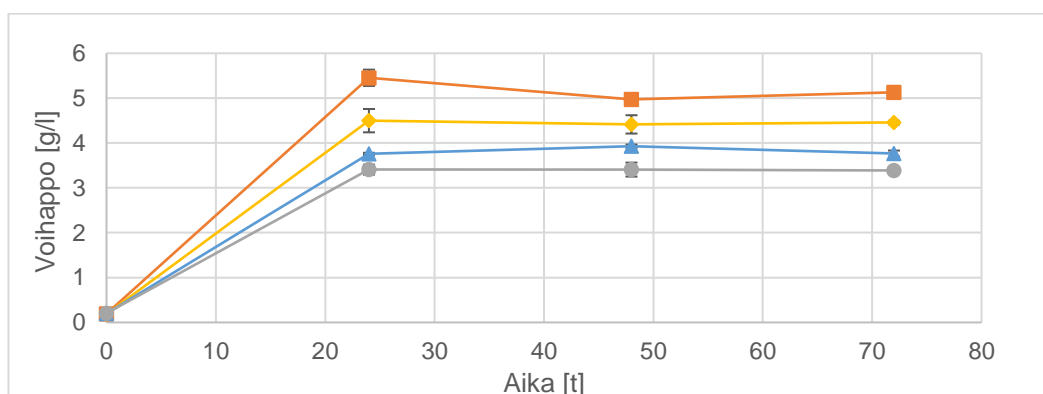


Kuva 12. Pullokasvatusten (50 ml) voihippopitoisuudet eri ajanhetkillä RCM-kasvatusalustalla *M. cerevisiae* ja *P. pentosaceus* -kantojen yhteisviljelyssä (▲) ja *M. cerevisiae* -kannan erillisviljelyssä (●) sekä RCM-kasvatusalustalla, johon oli lisätty fruktoosia 5 g/l (yhteisviljely ■ ja erillisviljely ◆). Kasvatusolosuhteet: anaerobinen, 30 °C ja hiljainen sekoitus.

P. pentosaceus -kannan erillisviljelyssä, kasvatuksen pH laski hiljalleen kasvatuksen aikana. *M. cerevisiae* -kannan erillisviljelyssä sekä molempien kantojen yhteisviljelyssä pH sen sijaan nousi kasvatuksen aikana huolimatta voihapsen muodostumisesta. Pullokasvatuksissa ei tehty pH:n säätelyä happo- tai emälsisäyksin.

5.2.2 Pullokasvatukset kaali- ja lanttu-RCM-alustoilla

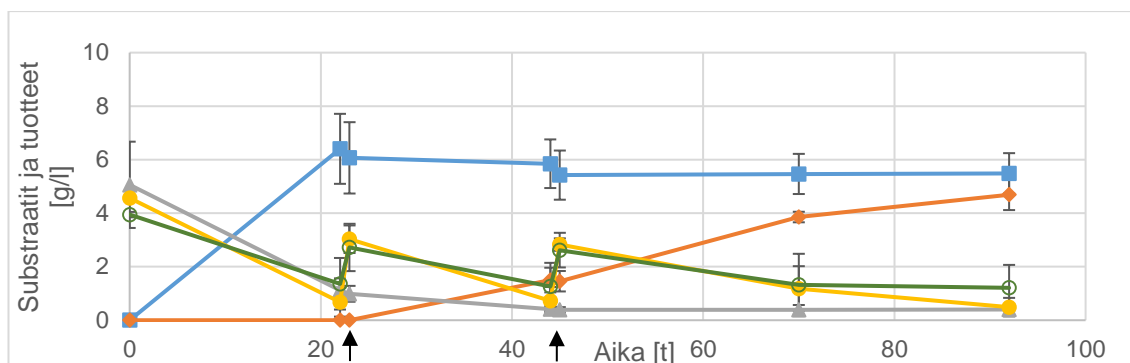
Molemmat bakteerikannat sopeutuivat sivuvirta-alustoihin. Koska alustojen substraattipitoisuudet olivat alhaisia (glukoosia ja fruktoosia yhteensä noin 3,5–4,0 g/l), jäivät myös voihsappipitoisuudet alhaisiksi (3,0–3,5 g/l). Kun substraattien määrä kaksinkertaistettiin, tämä ei juurikaan vaikuttanut voihsappipitoisuuksiin. Kaksinkertaisella substraatin määrällä *M. cerevisiae* -kanta tuotti noin 3,5–3,9 g/l voihsappia. Yhteisviljelyssä voihsappipitoisuudet saatiin kuitenkin nostettua hieman korkeammalle kuin erillisviljelyssä (kuva 13). Koska lanttu- ja kaalialustojen substraattipitoisuudet sekä glukoosin ja fruktoosin välinen suhde olivat erilaisia, ei voihsappipitoisuuksia voitu verrata suoraan keskenään.



Kuva 13. Voihsappipitoisuudet *M. cerevisiae* -kannan ja *P. pentosaceus* -kannan yhteisviljelyssä kaali- (■) ja lanttu-RCM-kasvatusalustoilla (◆) sekä *M. cerevisiae* -kannan erillisviljelyssä kaali- (▲) ja lanttu-RCM-alustalla (●). Kasvatusolosuhteet: anaerobinen, 30 °C, hiljainen sekoitus. Tulokset on esitetty kahden kasvatuksen keskiarvoina ja niiden keskihajontaa on kuvattu virhepalkeilla.

Pullokokeet toteutettiin myös panos-syöttökasvatuksina, jotta voitaisiin varmistaa, että substraattien määrä ei olisi rajoittava tekijä voihapsen muodostumiselle (kuva 14). Kasvatusalustana oli kaali-RCM-alusta, jossa oli lähtötilanteessa glukoosia ja fruktoosia yhteensä 10 g/l. Syöttö tapahtui kahtena sykäyksenä 23 ja 45 tuntia inokulaatiosta, sillä edellisten kasvatusten tulosten perusteella oli oletettavaa, että alustan sisältämät sokerit

olisi edellä mainittuina ajankohtina kulutettu lähes loppuun. Syötetty kaalimehu sisälsi glukoosia ja fruktoosia yhteensä 3,6 g/l per sykäys. Tulosten mukaan syöttö ei parantanut yhteisviljelyn voi happopitoisuutta. Ennen syötön aloitusta saavutettiin korkein voi happopitoisuus ($6,04 \pm 0,56$ g/l), joka laski hieman syötöstä johtuvan laimenemisen myötä. Voi hapon lisäksi yhteisviljelyssä muodostui huomattavia määriä maitohappoa. Kokeen aikana ei ollut huomattavissa, että *M. cerevisiae* olisi käyttänyt muodostunutta maitohappoa hiilenlähteenä.



Kuva 14. Voi hapon (■), maitohapon (◆), etikkahapon (▲), glukoosin (●) ja fruktoosin (○) pitoisuudet eri ajan hetkillä *M. cerevisiae* -kannan ja *P. pentosaceus* -kannan panos-syöttökasvatuksessa kaali-RCM-kasvatusalustalla (50 ml). Kasvatusolosuhteet: anaerobinen, 30 °C, hiljainen sekoitus. Syöttö tapahtui sykäyksinä 23 ja 45 tuntia inokulaatiosta (↑). Tulokset on esitetty kahden kasvatuksen keskiarvoina ja niiden keskihajontaa on kuvattu virhepalkeilla.

5.2.3 Pullokasvatukset omena- ja kaali-omena-RCM-alustoilla

Koska fruktoosi vaikutti olevan potentiaalisempi hiilenlähde voi hapon tuotossa, panos-syöttökokeet toteutettiin pullokoossa omena-RCM- ja kaali-omena-RCM-alustoilla, joissa fruktoosin osuus oli glukoosia korkeampi. Vaikka fruktoosia oli bakteerien saatavilla suurempia pitoisuuksia omena-RCM- (6,4 g/l) ja kaali-omena-RCM-kasvatusalustoilla (5,6 g/l) kuin kaali-RCM-alustalla (3,0 g/l), ei voi happopitoisuus noussut, vaan jäi samalle tasolle kuin kaali-RCM-alustalla. Tähän saattoi kuitenkin vaikuttaa kasvatusten pH, joka laski alle viiden asetaattipuskurista huolimatta. Syötön optimointi pullokasvatuksissa ei onnistunut, sillä pH:n säätäminen steriilisti kesken kasvatuksen oli hankalaa.

5.2.4 Pullokasvatukset mäski-RCM-alustoilla

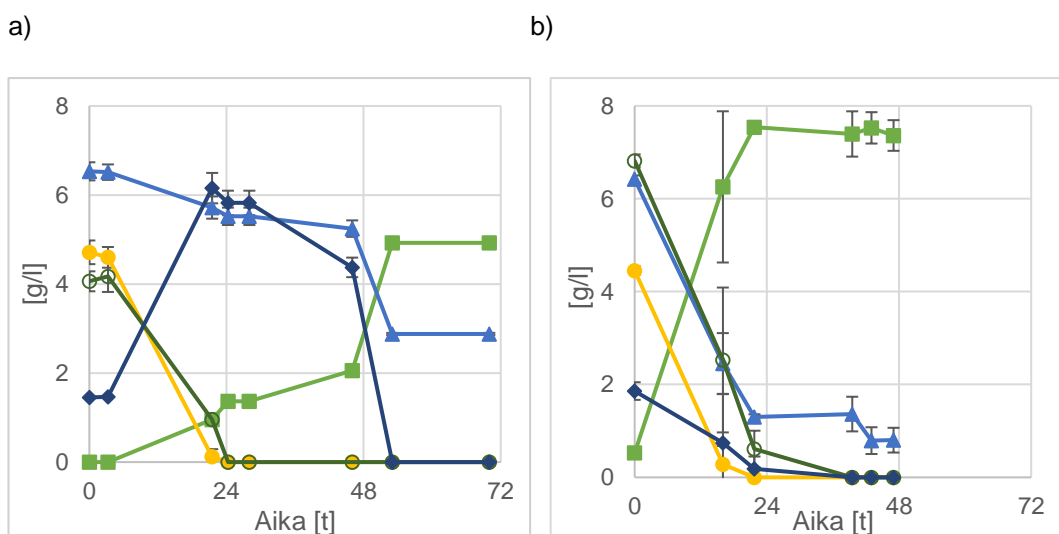
Mäski (Fat Lizard Brewing Company Oy, Suomi) poikkesi muista tutkimuksessa käytetyistä sivuvirroista siten, että sisälsi huomattavasti vähemmän käymiskelpoisia sokereita. Entsyymihydrolysoitu mäski (kuiva-ainepitoisuus 15 %) sisälsi glukoosia noin 2,5 g/l kun esimerkiksi kaalimehun ja -massan yhdistelmä sisälsi glukoosia noin 20 g/l ja fruktoosia 16,6 g/l. Mäskin hydrolysaatista fruktoosia ei löytynyt mitattavia määriä. Koska mäski-RCM-kasvatusalustojen sokeripitoisuudet jäivät alhaisiksi, ja hydrolysaattia oli käytössä vain rajallinen määrä, kasvatukset päätettiin tehdä ensin yksittäisillä kannoilla. Kasvua ei voitu seurata OD-mittauksin (optical density), sillä tumma kasvatusalusta häiritsi mitausta. Kasvun seuraaminen perustui siis kokonaisuudessaan substraattien kulutukseen ja tuotteiden muodostumiseen. *P. pentosaceus* kulutti kaiken tarjolla olevan glukoosin ensimmäisten 24 tunnin aikana ja tuotti maitohappoa alustan glukoosipitoisuudesta riippuen 6–9 g/l. Glukoosin lisäksi etikkahapon pitoisuus laski fermentoinnin aikana. Vaikka alustojen glukoosipitoisuus oli pyritty saamaan vakioksi, tähän ei päästy heterogeenisen materiaalin vuoksi. Kasvatusalusta (25 ml) sisälsi 22,5 ml hydrolysoitua mäskiä ja 2,5 ml modifioitua RCM-varastoliuosta (10x). Alustan tarkempi valmistus on esitetty luvussa 4.6. Kasvatusta jatkettiin 72 tuntia, jonka aikana muutoksia tuotteiden osalta ei ollut havaittavissa.

M. cerevisiae -kannan tunnetuille hiilenlähteille, kuten fruktoosille, laktaatille, arabinosille tai glukonaatille, ei löydetty vastetta HPLC-mittauksissa. Lisäksi aikaisemmissa kasvatuksissa oli selvinnyt, että se ei voinut hyödyntää mäskialustan sisältämää glukoosia ravinnoksi. Tästä huolimatta *M. cerevisiae* tuotti parhaimmillaan voi happoa 6 g/l. Tämä korkein pitoisuus saavutettiin hydrolysaatilla, joka oli käsitelty sekä Celli CTec2® että Protamex® -entsyymiseoksilla. Pelkällä Celli CTec2®-entsyymiseoksella käsitellystä hydrolysaatista *M. cerevisiae* muodosti voi happoa 4,8 g/l. Molemmissa tapauksissa etikkahappoa oli käytetty aineenvaihduntaan lähes yhtä suuri pitoisuus kuin muodostunutta voi happoa. Aikaisempien kasvatuksien perusteella etikkahappo ei ollut kuitenkaan yksinään riittävä substraatti voi hapon muodostamiseen, vaan saatavilla oli pitänyt olla myös fruktoosia tai laktaattia.

5.3 Bioreaktorikasvatukset

5.3.1 Alustan ja syötön optimointi

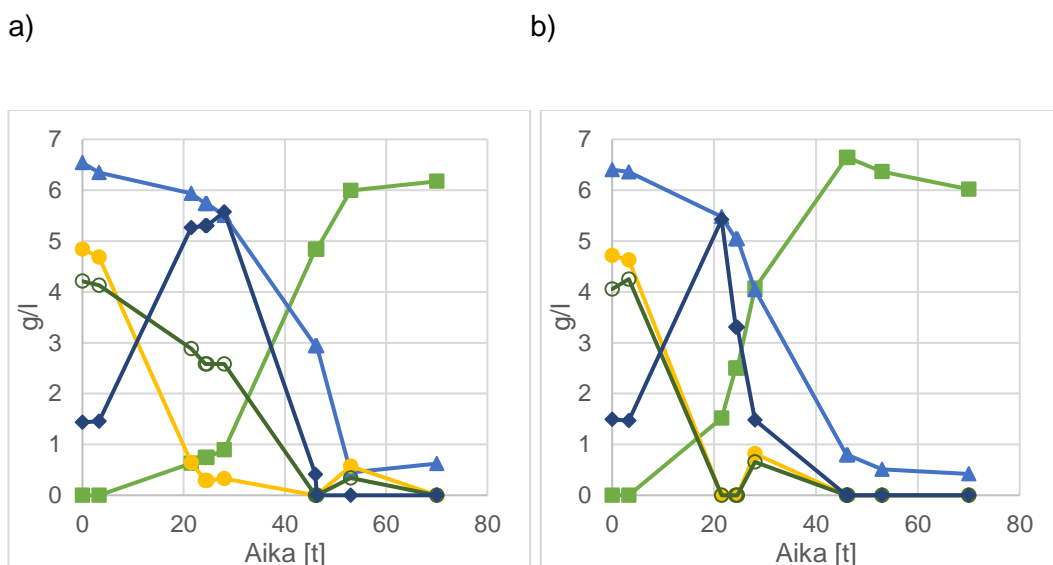
Fermentointeja tehtiin sekä panos- että panossyöttöfermentointeina. Kaikki fermentoinnit tehtiin kahden seulonnassa valitun kannan yhteisviljelyinä, sillä pullokokeissa se oli todistettu yksittäistä kantaa paremmaksi ratkaisuksi voihapsen tuoton osalta. Bioreaktorikasvatukset tehtiin kaali-, omena- ja kaali-omena-RCM-kasvatusalustoilla. Kaali-RCM-alustalla glukoosin ja fruktoosin pitoisuudet olivat lähes yhtä suuret ja glukoosin kulutuksen ja maitohapon muodostumisen välillä oli huomattavissa selkeä yhteys. Fruktoosia hyödynnettiin voihapsen tuottoon ja vasta sen jälkeen, kun fruktoosi oli kulutettu loppuun, maitohappoa hyödynnettiin aineenvaihdunnan välituotteena (kuva 15a). Kaali-omena-RCM-alustalla fruktoosia oli käytössä enemmän, jolloin maitohappoa muodostui melko korkea pitoisuus ($7,5 \pm 0,004$ g/l) ensimmäisten 21 tunnin aikana (kuva 15b). Maitohappoa ei joko muodostunut ollenkaan tai sitä käytettiin aineenvaihduntaan sen muodostumisenopeutta nopeammin. Kaali-omena-RCM-alustalla voihapsen tuotto oli siis huomattavasti nopeampaa kuin kaali-RCM-alustalla.



Kuva 15. Voihapsen (■), maitohapon (◆), etikkahapon (▲), glukoosin (●) ja fruktoosin (○) pitoisuudet eri ajan hetkillä *M. cerevisiae*-kannan ja *P. pentosaceus*-kannan panosfermentoinnissa kaali-RCM-kasvatusalustalla (a) ja kaali-omena-RCM-kasvatusalustalla (b). Kasvatusolosuhteet: anaerobinen, 30 °C, hiljainen sekoitus (150 rpm), pH noin 5,5. Tulokset on esitetty kahden kasvatuksen keskiarvoina ja niiden keskihajontaa on kuvattu virhepalkeilla

Panos-syöttöfermentoinneissa kasvu- ja hiilidioksidikäyrät eivät olleet yhtä yhteneväisiä kuin panosfermentoinnissa (liite 3, kuvat 1 ja 2). Tämä johtuu siitä, että syöttönopeudet vaihtelivat fermentoinnin aikana bioreaktorien välillä. Panos-syöttöfermentoinneissa kaali-RCM-alustoilla kaalimehun keskimääräiset syöttönopeudet olivat 2,1 ja 2,5 ml/t. Ensimmäiseen bioreaktoriin syötettiin yhteensä 56 ml kaalimehua 22 tunnissa (kuva 16a) ja toiseen bioreaktoriin 59 ml:aa 28,5 tunnissa (kuva 16b).

Kaali-RCM-alustalla panos-syöttöfermentoinnissa voihapon pitoisuus nousi hieman korkeammalle kuin panosfermentoinnissa. Panosfermentoinnissa voihappopitoisuus saavutti keskimäärin $4,9 \pm 0,02$ g/l, kun panos-syöttöfermentoinneissa vastaava luku oli $6,1 \pm 0,6$ g/l. Kaali-omena-RCM-alustalla ei saatu syötön avulla nostettua voihappopitoisuutta samaan tapaan kuin kaali-RCM-alustalla. Syötön lopettamisen jälkeen voihappopitoisuus ei kääntynyt nousuun, vaikka fruktoosi- ja glukoosipitoisuudet lähtivät laskuun. Tämä viittaisi jonkin muun aineenvaihduntatuotteen muodostumiseen, ja ainakin maitohappoa muodostui huomattava määrä ($7,5 \pm 2,0$ g/l) verrattuna panosfermentointiin, jossa maitohappoa ei muodostunut ollenkaan.



Kuva 16. Kaksi esimerkkiä *M. cerevisiae* -kannan ja *P. pentosaceus* -kannan yhteisviljelystä panos-syöttöfermentoinnissa kaali-RCM-kasvatusalustalla. Jatkuva kaalimehun syöttö tapahtui 24,5 ja 46 tunnin välillä keskimääräisellä syöttönopeudella 2,1 ml/t (a) tai 24,5 ja 53 tunnin välillä keskimääräisellä syöttönopeudella 2,5 ml/t (b). Voihapon (▲), maitohapon (◆), etikkahapon (△), glukoosin (●) ja fruktoosin (○) pitoisuudet eri ajan hetkillä. Kasvatusolosuhteet: anaerobinen, 30 °C, 150 rpm sekoitus, pH noin 5,5.

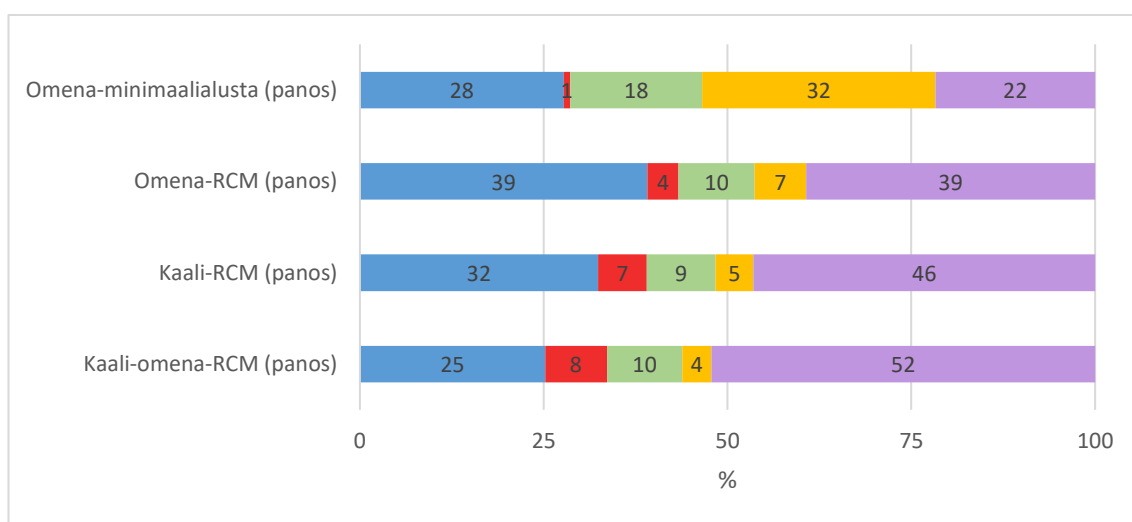
5.3.2 Asetaattipuskurin vaikutus voi happopitoisuuteen

Koska asetaattipuskurin sisältämän etikkahapon vaikutus aineenvaihduntaan haluttiin minimoida, osa fermentoinneista toteutettiin joko ilman puskuria tai epäorgaanisella PIPES-puskurilla (20 mM). Näin selvisi, miten paljon alustan sisältämä etikkahappo vaikuttaa voi hapon muodostumiseen. Bioreaktorissa kasvatuksen pH:ta säädettiin tarpeen mukaan, joten puskuria ei välttämättä tarvittu kasvatusalustassa. Fermentoinnit ilman puskuria toteutettiin panosfermentointina kaali-, kaali-omena- ja omena-RCM-alustoilla sekä omena-minimaalialustalla. Asetaattipuskurin poisjättäminen heikensi voi hapon tuottonopeutta ja voi happopitoisuus jäi huomattavasti alhaisemmaksi (taulukko 3). Suurin ero oli havaittavissa kaali-omena-RCM-kasvatusalustalla.

Taulukko 3. Voi hapon saantoja eri sivuvirta-kasvatusalustoilla (panosfermentointimenetelmä). Sokereiden kulutus ja voi hapon tuottonopeus on laskettu inokulaation ja ajanhetken välillä, jolloin korkein voi happopitoisuus on saavutettu. Tulokset on esitetty kahden kasvatuksen keskiarvoina.

	Sokereiden kulutus keskimäärin (g/l/t)		Korkein pitoisuus (g/l)	Voi hapon keskimääräinen tuottonopeus (g/l/t)
Kasvatusalusta	Glukoosi	Fruktoosi	Voi happo	
Kaali-RCM (asetaattipuskuri)	0,10 ± 0,00	0,09 ± 0,00	4,93 ± 0,02	0,11 ± 0,00
Kaali-omena-RCM (asetaattipuskuri)	0,20 ± 0,00	0,31 ± 0,00	7,54 ± 0,01	0,35 ± 0,00
Kaali-RCM (ei puskuria)	0,26 ± 0,03	0,14 ± 0,01	3,69 ± 0,08	0,14 ± 0,00
Kaali-omena-RCM (ei puskuria)	0,20 ± 0,01	0,24 ± 0,03	3,90 ± 0,11	0,15 ± 0,00
Omena-RCM (PIPES)	0,20 ± 0,00	0,38 ± 0,05	4,84 ± 0,04	0,13 ± 0,00
Omena-minimaalialusta (PIPES)	0,19 ± 0,00	0,29 ± 0,01	2,65 ± 0,06	0,07 ± 0,00

Omena-RCM-alustalla voi happopitoisuus sekä voi hapon muodostumisnopeus jäivät melko alhaisiksi huolimatta muita alustoja paremmasta substraattien kulutuksesta. Muiden mahdollisten aineenvaihduntatuotteiden (valeriaana-, kaproni-, etikka- ja propaanihappo) pitoisuudet tutkittiin kaasukromatografilla (kuva 17). Eri sivuvirta-RCM-kasvatusalustojen välillä tulokset olivat samansuuntaiset. Kaali-RCM-alustalla valeriaanahapon osuus oli suurempi kuin kaali-omena-RCM-alustalla, mikä tukee aikaisempia tutkimustuloksia [27], joiden mukaan *M. cerevisiae* tuottaisi fruktoosista pääasiassa voi happoa ja maitohaposta pääasiassa valeriaanahappoa. Toisaalta omena-RCM-alustalla, jossa fruktoosipitoisuus oli huomattavasti muita alustoja korkeampi (liite 5, kuvat 1a ja 1b), muodostui suhteessa lähes yhtä paljon valeriaanahappoa kuin voi happoa.



Kuva 17. Valeriaanahapon (sininen), kapronihapon (punainen), etikkahapon (vihreä), propaanihapon (keltainen) ja voi hapon (violetti) prosentuaaliset osuudet kaasukromatografilla mitatuista karboksyylihapoista. Loppupisteet panosfermentoinneissa 46–48 tuntia inokulaatiosta.

Omena valikoitui korkean fruktoosipitoisuuden takia sivuvirraksi myös minimaalialustaan. Verrattuna omena-RCM-kasvatusalustaan omena-minimaalialustalla voi happoa muodostui lähes puolet vähemmän yhtäläisestä substraattien kulutuksesta huolimatta (liite 5, kuvat 2a ja 2b). Minimaalialustalla karboksyylihappojen osuudet poikkesivat muista tutkituista kasvualustoista siten, että propaanihapon osuus kattoi kolmanneksen mitatuista karboksyylihapoista, kun muilla alustoilla se oli alle 10 %.

6 Tulosten tarkastelu

Tämä insinööri työ toteutettiin osana BIOCHEM-projektia, jossa on tavoitteena jätevirtoja hyödyntäen tuottaa arvokemikaaleja fermentointiprosessissa. Työssä seulottiin bakteerikantoja VTT:n kantakokoelmasta fermentointiprosessiin, jossa elintarviketeollisuuden sivuvirtoja hyödyntäen, oli tavoitteena tuottaa voihappoa. Bakteerikantoja haluttiin kasvattaa yhdessä, sillä yhteisviljelyn on tutkimusten mukaan osoitettu parantavan voihapon saantoa [3, s. 373]. Työn kokeellinen osa koostui kasvualustojen alkuseulonnasta, potentiaalisten bakteerikantojen seulonnasta sekä kasvatusolosuhteiden optimoinnista pullo- ja bioreaktoritilavuuksissa.

Kasvualustojen alkuseulonnassa valittiin silmämääräisesti sameutta arvioimalla paras kasvualusta kolmen vaihtoehdon joukosta. Alustojen vertailua hankaloitti niiden sävyerot sekä se, että arvioija vaihtui kesken kasvatusten. Silmämääräistä arviointia ei muutenkaan voida pitää tieteellisesti luotettavana siihen liittyvien epävarmuustekijöiden vuoksi. Myöhemmässä vaiheessa bakteerien kasvua arvioitiin solumassan aiheuttaman sameuden perusteella spektrofotometrillä. Sivuvirta-alustoista tehdyt mittaukset ovat kuitenkin parhaimmillaan suuntaa antavia, sillä mittaamista häiritsi erilaiset sivuvirtapartikkelit. Omena-, kaali- ja lanttupartikkelit pyrittiin painamaan näyteastian pohjalle nopealla sentrifugoinnilla, mikä saattoi samalla painaa myös soluja astian pohjalle. Toisaalta pienempiä sivuvirtapartikkeleja saattoi päätyä myös kuoppalevyllä spektrofotometriin, mikäli sentrifugointiaika ei ollut riittävän pitkä. Sameuden mittaaminen ei ollut sivuvirtakasvatuksissa ainoa kasvun mittari, vaan bioreaktoreissa prosessin etenemistä voitiin seurata myös mittaamalla ulostulokaasun hiilidioksidipitoisuutta. Kaikissa kasvatuksissa kasvua seurattiin myös tarkkailemalla glukoosin ja fruktoosin pitoisuuksia alustassa eri ajan hetkillä.

Kasvatusten aikana sokereiden pitoisuus laski ja tuotteiden (orgaaniset hapot) pitoisuus kasvoi ajan kuluessa. Osassa kasvatuksia voihappopitoisuutta analysoitiin sekä HPLC:llä että kaasukromatografilla. Kahden eri analyysimenetelmän välillä oli pieniä eroavaisuuksia voihappopitoisuuksissa. Tämä voi johtua monesta eri tekijästä, mutta yksi syy voi olla se, että lyhytkestuisilla rasvahapoilla biologinen hajoaminen tapahtuu melko helposti. Näytteiden säilytys ja käsittely ovat siksi ongelmallisia. Hajoamista voidaan kuitenkin hidastaa kylmäsäilytyksellä (alle 4 °C). [36 s. 477.] Kummallakaan menetelmällä mahdollista haihtumista ei ole huomioitu laskuissa.

Kaali ja omena esikäsiteltiin mehupuristimella ja pakastettiin noin puolen kilon erissä. Sokeripitoisuus mitattiin kaali- ja omenanäytteistä, jotka oli koottu muutamasta erästä kyseistä sivuvirtaa. Mitattu sokeripitoisuus oli siis ikään kuin keskiarvo esikäsitellyille sivuvirroille. Jokaiselle puolen kilon erälle ei tehty omaa sokerianalyysia. Kasvatukseen käytetyn sivuvirran todellinen sokeripitoisuus saattoi siis vaihdella eräkohtaisesti. Sivuvirtojen heterogeenisyys asetti haasteita kasvatusalustan valmistukselle ja toi epävarmuutta fermentointiprosessin toistettavuuteen. Koska kasvatusalustoissa haluttiin hyödyntää koko materiaali, sekä mehu että massa, oli sivuvirta mahdoton saada tasaisesti jaettua pullojen tai bioreaktorien kesken. Tämän takia alustojen välillä oli eroa fruktoosi- ja glukoosipitoisuuksissa. Mitä enemmän alustassa oli fruktoosia, sitä nopeammin saavutettiin voihapon korkein pitoisuus. Olosuhteet bioreaktoreissa olivat yhteneviä lukuun ottamatta kasvatusalustan ja syötön vaihtelua. Alustan optimoinnin lisäksi voihapon tuottoa olisi mielenkiintoista seurata eri pH:ssa.

Tässä tutkimuksessa parhaat tulokset saavutettiin panosfermentoinnissa. Panos-syöttöfermentoinneissa syötöllä parannettiin lähinnä muiden aineenvaihduntatuotteiden kuin voihapon muodostumista. Teollisessa mittakaavassa järkevin fermentointitapa olisi kuitenkin jatkuvatoiminen fermentointi, jossa substraatin, solumassan ja tuotteiden pitoisuudet pysyvät vakioina. Koska voihamppo ja muut aineenvaihduntatuotteet inhiboivat bakteerien kasvua, parhaimpiin tuloksiin päästäisiin luultavimmin tuotteiden jatkuvatoimisella erotusmenetelmällä. Jotta prosessista saataisiin taloudellisesti kannattavaa, syötön optimoinnin lisäksi, kasvatusalussa käytettyjä ravintoaineita, kuten hiivauutetta tulisi vähentää. Mitä vähemmän ravintoaineita alustaan täytyy lisätä, sitä alhaisemmiksi saadaan materiaalikulut laskettua.

Koska voihamppoa tuottavien bakteerikantojen tiedetään olevan vaativia ravintoaineiden suhteen [4, s.2], fermentointi liian yksinkertaisella kasvatusalustalla ei ole toimiva ratkaisu. Tässä tutkimuksessa käytetty minimaalialusta ei pärjännyt voihapon tuotossa ravintorikkaalle RCM-alustalle. Minimaalialustalla muodostui sen sijaan huomattavia määriä voihamppoa yksinkertaisempaa propaanihamppoa. Minimaalialusta vaatii siis vielä kehitystyötä aineenvaihduntareaktioiden kääntämiseksi voihapon suuntaan. Bakteereilla on useita mahdollisia aineenvaihduntareittejä voihapon tuottamiseksi, ja tässä tutkimuksessa käytettyjen kantojen, *M. cerevisiae* ja *P. pentosaceus*, yhteisviljelyn aineenvai-

duntareaktiot alkavat vasta selkeytyä. Tulosten perusteella voidaankin kuitenkin vahvistaa, että *M. cerevisiae* kuluttaa fruktoosin lisäksi *P. pentosaceus* -kannan glukoosista muodostaman laktaatin voihamon tuotantoon, mikä kasvattaa saantoa yhteisviljelyssä. BIOCHEM-projektipartnerit tekevät parhaillaan aineenvaihduntareittien mallinnusta. Yksinkertainen minimaalialusta sopi hyvin aineenvaihduntareaktioiden mallintamiseen, sillä se ei sisältänyt RCM-kasvatusalustan tapaan etikkahappoa. Etikkahappo toimii sekä substraattina että tuotteena, joten se sekoittaa hiilitasapainon laskemista.

Yhteisviljelyssä tapahtuvien aineenvaihduntareaktioiden ymmärtämistä auttaisi myös mikrobipopulaation kasvun seuranta esimerkiksi qPCR-menetelmällä (engl. quantitative polymerase chain reaction). qPCR kertoo, kuinka paljon näyte sisältää jotakin tiettyä DNA-sekvenssiä. Menetelmää varten tarvitaan kullekin bakteerikannalle yksilöllinen aluke, joka kiinnittyy DNA-sekvenssiin. [37.] Näin ollen sen avulla voidaan tunnistaa, kuinka suuri populaatio kutakin kantaa yhteisviljelyssä on kasvatuksen aikana, menestykö toinen kanta toista paremmin ja onko eri kasvatusalustojen välillä eroa.

Tässä työssä fermentointien tuloksia on tarkasteltu voihamon pitoisuuksien ja tuottonopeuksien avulla (taulukko 4). Korkeimmat voihamonpitoisuudet saavutettiin silloin, kun alustaan oli lisätty asetaattipuskuria, ja paras tuottavuus oli kaali-omena-RCM-kasvatusalustalla. Tällä alustalla päästiin lähes yhtä suureen tuottavuuteen kuin puhtaalla fruktoosilla. Heikoimmin tutkimuksessa pärjasi minimaalialusta. Tämä voisi johtua siitä, että minimaalialustalla ei ole riittävästi ravinteita monimutkaisempien karboksyylihapojen muodostamiseen. Minimaalialustan potentiaalin parantamiseksi tarvitaan lisätietoa yhteisviljelyn aineenvaihduntareiteistä voihamon tuottamiseksi.

Pullo- ja bioreaktorilavuuksien vertailun tulos on epäselvä, sillä kaali-RCM-alustalla korkeampiin voihamonpitoisuuksiin päästiin pullotilavuudessa, kun taas kaali-omena-RCM-alustalla tulos oli päinvastainen. Omena-RCM-alustan osalta vertailu ei ole järkevää, sillä pullotilavuudessa käytettiin asetaattipuskuria ja bioreaktorissa taas epäorgaanista PI-PES-puskuria. Vaikka tutkimuksessa saavutettuja voihamonpitoisuuksia ei voida suoraan verrata keskenään johtuen alustojen vaihtelevista substraattipitoisuuksista, nämä kertovat kuitenkin tutkimuksessa käytettyjen kantojen kohtuullisesta voihamonsietokyvystä, ja ovat siksi olennainen osa tuloksia.

Taulukko 4. Yhteenveto voihapsen pitoisuuksista, tuottavuuksista ja saannoista eri kasvatusalustoilla ja tilavuuksilla *M. cerevisiae* -kannan ja *P. pentosaceus* -kannan yhteisviljelyssä. RCM-kasvatusalustojen selitteet k = kaali, l = lanttu, f = fruktoosilisä 10 g/l, o = omena, ko = kaali-omena, MMo = Minimaalialusta, jossa substraattina omenamehu. * = ei sisällä asetaattipuskuria. Tulokset on esitetty kahden kasvatuksen keskiarvoina.

Olosuhteet		Voihappo	
Kasvatusalusta	Kasvatus pullossa / bioreaktorissa	Pitoisuus [g/l]	Tuottavuus [g/l/t]
RCMk	Pullo	5,45 ± 0,18	0,23 ± 0,01
RCMk	Bioreaktori	4,93 ± 0,02	0,11 ± 0,00
*RCMk	Bioreaktori	3,69 ± 0,08	0,14 ± 0,00
RCMko	Pullo	6,12 ± 0,32	0,25 ± 0,01
RCMko	Bioreaktori	7,54 ± 0,00	0,34 ± 0,00
*RCMko	Bioreaktori	3,90 ± 0,11	0,15 ± 0,00
RCMo	Pullo	6,45 ± 0,04	0,27 ± 0,00
*RCMo	Bioreaktori	4,84 ± 0,04	0,15 ± 0,00
*MMo	Bioreaktori	2,65 ± 0,06	0,08 ± 0,00
RCMI	Pullo	4,50 ± 0,26	0,19 ± 0,01
RCMf	Bioreaktori	8,29 ± 0,02	0,35 ± 0,00

Koska *M. cerevisiae* -kannan ja *P. pentosaceus* -kannan yhteisviljelyn aineenvaihduntareittejä ei vielä täysin tunneta, voihapsen saantojen laskeminen on epävarmaa. Lisäksi saantojen laskemista sekoittaa kasvatusalustojen sisältämä etikkahappoa, sillä sen todellista kulutusta ja tuottoa on mahdoton arvioida. Voihapsen teoreettinen saanto riippuu käytetystä aineenvaihduntareitistä. Todennäköisesti osa fruktoosista ja glukoosista käytetään solumassan kasvuun ja osa muutetaan maitohapoksi. Seuraavassa vaiheessa maitohappoa muutetaan toiseksi orgaanisiksi hapoiksi. Tällöin osa hiilenlähteistä menetetään hiilidioksidin muodossa. Esimerkiksi jos lähtöarvona olisi 180 g maitohappoa, siitä voisi teoriassa muodostua 88 g voihapsa, 88 g hiilidioksidia ja 4 g vetyä. Mikäli ei huomioida solumassan kasvuun käytettäviä hiilenlähteitä, voihapsen teoreettinen saanto olisi 0,49 g voihapsa per g fruktoosia/glukoosia. Hiilidioksidi vie siis suuren osan käytettävissä olevista hiilenlähteistä.

Todellisuudessa saannot ovat kuitenkin paljon alhaisempia, sillä bakteerit käyttävät hiilenlähteitä myös monen muun aineenvaihduntatuotteen kuten etikkahapon valmistukseen. Paljon tutkituilla *Clostridia*-suvun bakteereilla on geenimuuntelun avulla heikennetty bakteerikantojen kykyä tuottaa etikkahappoa samalla kun on parannettu voihapsen

tuottokykyä sekä vahvistettu niiden kykyä sietää voihippaa. Verrattuna luonnollisiin kantoihin geenimuunnelluilla kannoilla on saatu korkeampia voihippopitoisuuksia sekä parempia saantoja. Varjopuolena on kuitenkin huomattu, että voihipon tuotantoon muokattu *Clostridia*-kannat kärsivät hitaasta solumassan kasvusta. [22, s. 659–660.] Tässä työssä ei käytetty geenimuunneltuja bakteerikantoja, vaan parempiin tuottavuuksiin oli tarkoitus päästä optimoimalla kasvuolosuhteita.

Tutkimusaikataulun puitteissa oli mahdollista testata bioreaktoriolosuhteissa kolmea eri sivuvirtaa, jotka olivat kaali, lanttu ja omena. Vaikka kaikki sivuvirrat toimivat prosessissa, olisi mielenkiintoista tutkia myös muita potentiaalisia sivuvirtoja. *M. cerevisiae* tunnetaan oluenpilaajabakteerina, joten tutkimusta voisi jatkaa oluenvalmistuksessa syntyvillä sivuvirroilla. Entsyymihydrolysoidulla mäskillä tehdyt pullokokeet antoivat yllättäviä tuloksia, kun voihippaa muodostui parhaimmillaan 6 g/l, vaikka alustassa ei ollut lainkaan fruktoosia. Mäskin potentiaali voihipon tuotossa jäi kuitenkin avoimeksi kysymykseksi aikataulullisista syistä johtuen. Yleisesti mäskin ravintoarvo on melko korkea, sillä se sisältää runsaasti proteiineja ja vitamiineja [38, s. 213–214]. Tässä tutkimuksessa käytetyn mäskin ravintosisältöä ei tutkittu muutoin kuin monosakkaridien osalta.

Proteiineja pilkkovan Protamex®-entsyymiseoksen käyttäminen paransi voihipon pitoisuutta mäskikokeissa. Tämä saattaisi viitata siihen, että *M. cerevisiae* pystyy tuottamaan voihippaa myös proteiinilähtöisten aineenvaihduntareittien kautta. Tämä selittäisi myös sen, miksi voihippaa muodostui kasvatuksissa, vaikka lähtötilanteessa kasvatusalustassa ei ollut lainkaan fruktoosia. Koska kaikki aineenvaihduntareitit yhdistyvät ennen viimeisiä vaiheita voihipon muodostamisessa, käytetään etikkahappoa mahdollisesti samaan tapaan kaikissa aineenvaihduntareiteissä eli butyryyli-KoA:n muuttamiseksi voihipoksi. *P. pentosaceus* tuotti mäskikokeissa maitohappoa paremmin ilman Protamex®-entsyymiseosta kuin sen kanssa. Tämä johtuu kuitenkin luultavimmin siitä, että vaikka lignoselluloosaa pilkkovia entsyymejä oli lisätty sama määrä, alustojen glukoosipitoisuus poikkesi toisistaan. Mäskialustoilla ei tehty yhteiskasvatuksia, mutta muiden kasvatuskokeiden perusteella voidaan todeta, että yhteiskasvatus voisi potentiaalisesti nostaa voihipon tuottoa entisestään.

Kaikki kasvatukset sivuvirta-alustoilla lukuun ottamatta mäskiä tehtiin duplikaatteina. Duplikaattien tulokset olivat keskenään saman suuntaisia, mikä parantaa tulosten luotettavuutta. Koska mäskillä tehdyistä kasvatuskokeista saatiin vain yksittäisiä tuloksia, ei niiden perusteella voida tehdä johtopäätöksiä. Mäski-RCM-alustalla tehtyjen kasvatusten tulosten luotettavuuden parantamiseksi tulisi suorittaa laajemmat kasvatuskokeet ilman asetaattipuskuria, jotta nähtäisiin hydrolysoidun mäskin todellinen potentiaali voihapon tuotannossa.

Tässä työssä kehitettyä fermentointiprosessia voidaan mahdollisesti hyödyntää BIOCHEM-projektin seuraavissa vaiheissa, joissa tutkitaan menetelmiä voihapon ja mahdollisesti muiden aineenvaihduntatuotteiden erottamiseksi sivuvirta-alustasta elektrodialyysin avulla sekä mitoitetaan fermentointiprosessi suurempaan mittakaavaan. Mittakaavaa kasvatettaessa prosessi tulee miettiä uudestaan. On ratkaistava, miten prosessi saadaan pysymään anaerobisena ja millä laitteistolla sivuvirtojen käsittely tehdään. Mikäli soluja tarvitaan siirtää bioreaktoriin suurempi tilavuus, voidaan tehdä kaksivaiheinen siirrostus, jolloin solujen siirtäminen voidaan tehdä anaerobisesta bioreaktorista toiseen pumpaamalla. Näin ollen soluja altistetaan mahdollisimman vähän hapelle. Kun jälkikäsittely on saatu toimivaksi ja voihappoa sekä muita aineenvaihduntatuotteita voidaan poistaa fermentoinnin aikana, ne eivät häiritse bakteerien kasvua ja aineenvaihduntaa, jolloin päästään korkeampiin voihappopitoisuuksiin ja tuottavuuteen.

7 Yhteenveto

Tässä insinööriyössä selvitettiin elintarviketeollisuuden sivuvirtojen potentiaalia voi-hapon tuotannossa. Voihappoa pidetään arvokemikaalina sen lukuisien eri käyttökohteiden takia. Tutkimuksen tulosten perusteella voidaan todeta, että hyödyntämällä ravinto-rikkaita kasviperäisiä sivuvirtoja kuten lanttua, kaalia tai omenaa, voidaan tuottaa voi-happoa silloin, kun sivuvirta on rikastettu bakteerien kasvua tukevilla ravinteilla.

Kantojen seulonnassa havaittiin, että voi-hapon tuottajakanta *M. cerevisiae* E-981087 sekä maitohapon tuottajakanta *P. pentosaceus* E-153483 kestivät muita kantoja paremmin voi-happoa, joten ne valittiin yhteisviljelyyn sivuvirta-alustoilla. Yhteisviljelyssä varmistettiin, että *M. cerevisiae* pystyi hyödyntämään myös *P. pentosaceus* -kannan tuottaman maitohapon hiilenlähteenä voi-hapon valmistuksessa. Pullokasvatuksissa huomattiin, että valittujen bakteerikantojen yhteisviljely tuotti korkeampia voi-happopitoisuuksia kuin yksittäisten bakteerikantojen viljely, sillä hiilenlähteeksi kelpaavien substraattien määrä oli suurempi.

Suurin voi-happopitoisuus (7,5 g/l) saavutettiin panosfermentoinnissa kaali-omena-RCM-kasvatusalustalla, kun käytössä oli asetaattipuskuri. Asetaatti eli etikkahappo näyttäisi edesauttavan voi-hapon muodostumista, sillä asetaattipuskurin pois jättäminen vähensi voi-hapon muodostumista huomattavasti. Monissa kasvatuskokeissa substraatin eli sivuvirran määrä todettiin rajoittavaksi tekijäksi. Substraattien määrän nostaminen ei kuitenkaan automaattisesti parantanut voi-hapon tuottoa, vaan lisäsi muiden aineenvaihduntatuotteiden muodostumista. Myöskään syöttö ei parantanut voi-hapon muodostumista kasvatuksissa samalla tavalla kuin muiden aineenvaihduntatuotteiden. Sen sijaan panos-syöttöfermentointi edisti valeriaana-, kaproni-, etikka-, propioni- ja maitohappojen muodostumista. Koska kyseessä on kahden bakteerikannan yhteisviljely, jossa aineenvaihduntareaktiot ovat melko monimutkaiset, ei syytä tähän voida tämän tutkimuksen perusteella sanoa. Panos-syöttöfermentoinnin optimointi voi-hapon tuottamiseksi vaatii lisätutkimuksia. BIOCHEM-projektipartnerien toimesta mallinnetaan aineenvaihduntareaktioita sekä tutkitaan voi-hapon erottamista fermentointiliuoksesta. Yhteistyöntulokset fermentointiprosessi siirretään suurempaan mittakaavaan, jolloin saadaan lisätietoa prosessin toimivuudesta pilot-mittakaavassa.

Lähteet

- 1 Liu, Siqing; Bischoff, Kenneth; Leathers, Tomothy; Qureshi, Nasib; Rich, Joseph & Hughes, Stephen. 2013. Butyric acid from anaerobic fermentation of lignocellulosic biomass hydrolysates by *Clostridium tyrobutyricum* strain RPT-4213. *Bioresource Technology*. Vol. 143, s. 322–329.
- 2 Baroi, G.N.; Gavala, H.N.; Westermann, P. & Skiadas, I.V. 2017. Fermentative production of butyric acid from wheat straw: Economic evaluation. *Industrial Crops and Products*. Vol. 104, s. 68–80.
- 3 Bader, J.; Mast-Gerlach, E.; Popovic, M.K.; Bajpai, R & Stahl, U. 2010. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 109, s. 371–387.
- 4 Dwidar, Mohammed; Park, Jae-Yeon; Mitchell, Robert & Sang, Byoung-In. 2012. The Future of Butyric Acid in Industry. *The Scientific World Journal*. Volume 2012, s. 1–9.
- 5 Wainaina, Steven; Parchami, Mohsen; Mahboubi, Amir; Horváth, Ilona & Taherzadeh, Mohammad. 2019. Food waste-derived volatile fatty acids platform using an immersed membrane bioreactor. *Bioresource Technology*. Vol. 274, s. 329–334.
- 6 Luo, Hongzhen; Yang, Rongling; Zhao, Yuping; Wang, Zhaoyu; Liu, Zheng; Huang, Mengyu & Zeng, Qingwei. 2018. Recent advances and strategies in process and strain engineering for the production of butyric acid by microbial fermentation. *Bioresource Technology*. Vol. 253, s. 343–354.
- 7 Strazzer, Giuseppe; Battista, Federico; Garcia, Natalia Herrero; Frison, Nicola & Bolzonella, David. 2018. Volatile fatty acids production from food wastes for biorefinery platforms: A review. *Journal of Environmental Management*. Vol. 226, s. 278–288.
- 8 Kim, Hyunjin; Jeon, Byoung Seung, Pandey, Ashok & Sang, Byoung-In. 2018. New coculture system of *Clostridium* spp. and *Megasphaera hexanoica* using submerged hollow-fiber membrane bioreactors for caproic acid production. *Bioresource Technology*. Vol. 270, s. 498–503.
- 9 Kierrolla kärkeen – Suomen tiekartta kiertotalouteen 2016–2025. 2016. Verkkoaineisto. Suomen itsenäisyyden juhlarahasto Sitra. <<https://media.sitra.fi/2017/02/27175308/Selvityksia117-3.pdf>>. Luettu 24.5.2019.

- 10 Berg, Jenny. ETL:n jäte- ja sivuvirtaselvitys 2016. Verkkoaineisto. Elintarviketeollisuusliitto ETL. <http://www.etl.fi/media/aineistot/raportit-ja-katsaukset/etl-jate_ja_sivuvirtaselvitys_2016.pdf>. Luettu 24.5.2019.
- 11 Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention. 2011. Verkkoaineisto. Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO. <<http://www.fao.org/3/a-i2697e.pdf>>. Luettu 4.6.2019
- 12 Atasoy, Merve; Owusu-Agyeman, Isaac; Plaza, Elzbieta & Cetecioglu, Zeynep. 2018. Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: Current status and future challenges. *Bioresource Technology*. Vol. 268, s. 773–786.
- 13 VAHTI muuttuu YLVAksi – ympäristölupien valvonnan sähköinen asiointi uudistuu. 2017. Verkkoaineisto. Ympäristöministeriö. <[https://www.ymparisto.fi/fi-FI/Asiointi_luvat_ja_ymparistovaikutusten_arviointi/VAHTI_muuttuu_YLVAksi__ymparistolupien_v\(43697\)>](https://www.ymparisto.fi/fi-FI/Asiointi_luvat_ja_ymparistovaikutusten_arviointi/VAHTI_muuttuu_YLVAksi__ymparistolupien_v(43697)>)>. Luettu 24.5.2019.
- 14 Marttinen, Sanna; Venelampi, Olli; Iho, Antti; Koikkalainen, Kauko; Lehtonen, Eeva; Luostarinen, Sari; Rasa, Kimmo; Sarvi, Minna; Tampio, Elina; Turtola, Eila; Ylivainio, Kari; Grönroos, Juha; Kauppila, Jussi; Koskiahho, Jari; Valve, Helena; Laine-Ylijoki, Jutta; Lantto, Raija; Oasmaa, Anja & zu Castell-Rüdenhausen, Malin. 2017. Kohti ravinteiden kierrätyksen läpimurtoa. Nykytila ja suositukset ohjauskeinojen kehittämiseksi Suomessa. Luonnonvara- ja biotalouden tutkimus 45/2017. Luonnonvarakeskus, Helsinki.
- 15 Agler, Matthew; Wrenn, Brian; Zinder, Stephen & Angenent, Largus. 2011. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. *Trends in Biotechnology*. Vol. 29, s. 70–78.
- 16 Syty kiertotaloudesta! – Yhdessä kiinni kasvuun. 2016. Verkkoaineisto. Elinkeinoelämän keskusliitto EK. <https://ek.fi/wp-content/uploads/Syty_kiertotaloudesta_aukeamittain_web.pdf>. Luettu 24.5.2019.
- 17 Singhania, Reeta Rani; Patel, Anil Kumar; Christophe, Gwendoline; Fontanille, Pierre & Larroche, Christian. 2012. Biological upgrading of volatile fatty acids, key intermediates for the valorization of biowaste through dark anaerobic fermentation. *Bioresource Technology*. Vol. 145, s. 166–174.
- 18 den Boer, Emilia; Lukaszewska, Agnieszka; Kluczkiewicz, Władysław; Lewandowska, Daria; King, Kevin; Reijonen, Tero; Kuhmonen, Tero; Suhonen, Anssi; Jääskeläinen, Ari; Heitto, Anneli; Laatikainen, Reino & Hakalehto, Elias. 2016. Volatile fatty acids as an added value from biowaste. *International Journal of Integrated Waste Management, Science and Technology*. Vol. 58, s. 62–69.

- 19 Baroi, G.N.; Skiadas, I.V.; Westermann, P. & Gavala, H.N. 2015. Continuous Fermentation of Wheat Straw Hydrolysate by *Clostridium tyrobutyricum* with In-Situ Acids Removal. *Waste and Biomass Valorization*. Vol. 6, s. 317–326.
- 20 Prado-Rubio, Oscar Andrés. 2010. Integration of Bioreactor and Membrane Separation Processes: A model based approach. Ph.D. thesis. Technical University of Denmark. København: J&R Frydenberg A/S.
- 21 Zigová, J. & Šturdík, E. 2000. Advances in biotechnological production of butyric acid. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. Vol. 24, s. 153–160.
- 22 Zhang, Chunhui; Yang, Hua; Yang, Fangxiao & Ma, Yujiu. 2009. Current Progress on Butyric Acid Production by Fermentation. *Current Microbiology*. Vol. 59, s. 656–663.
- 23 de Vienne, D. M. 2016. Verkkoaineisto. Lifemap: Exploring the Entire Tree of Life. *PLoS Biol.* <<http://lifemap-ncbi.univ-lyon1.fr/?tid=186801>>. Luettu 27.5.2019.
- 24 Paradh , Ashtavinayak & Hill, Annie Elizabeth. 2016. Review: Gram Negative Bacteria in Brewing. *Advances in Microbiology*. Vol. 6, s. 195–209.
- 25 Rolfe, Rial D; Hentges, David J; Campbell, Benedict J. & Barrett, James T. 1978. Factors Related to the Oxygen Tolerance of Anaerobic Bacteria. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 36, s. 306–313.
- 26 Jeon, Byoung Seung; Kim, Seil & Sang, Byoung-In. 2017. *Megasphaera hexanoica* sp. nov., a medium-chain carboxylic acid-producing bacterium isolated from a cow rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 67, s. 2114–2120.
- 27 Chelack, Brian J. & Ingledew, W.M. 1987. Anaerobic Gram-Negative Bacteria in Brewing—A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. Vol. 45, s. 123–127.
- 28 Vital, Marius; Howe, Adina Chuang & Tiedje, James M. 2014. Revealing the Bacterial Butyrate Synthesis Pathways by Analyzing (Meta)genomic Data. *mBio by The American Society for Microbiology*. Vol. 5, s. 1–11.
- 29 Sánchez-Pascuala, Alberto; de Lorenzo, Victor & Nikel, Pablo I. 2017. Refactoring the Embden–Meyerhof–Parnas Pathway as a Whole of Portable Gluco-Bricks for Implantation of Glycolytic Modules in Gram- Negative Bacteria. *American Chemical Society ACS Synthetic Biology*. Vol. 6, s. 793–805.

- 30 Louis, Petra & Flint, Harry J. 2008. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Federation of European Microbiological Societies FEMS Microbiology Letters*. Vol. 294, s. 1–8.
- 31 Furdui, Cristina & Ragsdale, Stephen W. 2000. The Role of Pyruvate Ferredoxin Oxidoreductase in Pyruvate Synthesis during Autotrophic Growth by the Wood-Ljungdahl Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 275, s. 28494–28499.
- 32 Butanoate metabolism – *Megasphaera elsdenii*. 2019. Verkkoaineisto. Kanehisa Laboratories. <https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?med00650>. Luettu 27.5.2019.
- 33 Vivek, Narisetty; Nair, Lakshmi M; Mohan, Binoop; Nair, Salini Chandrasekharan; Sindhu, Raveendran; Pandey, Ashok; Shurpali, Narasinha & Binod, Parameswaran. 2019. Bio-butanol production from rice straw – recent trends, possibilities, and challenges. *Bioresource Technology Reports*. Accepted Manuscript. s.1–73.
- 34 Spirito, Catherine M; Richter, Hanno; Rabaey, Korneel; Stams, Alfons JM & Ngenent, Largus T. 2014. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 27, s.115–122.
- 35 Suo, Yukai; Ren, Mengmeng; Yang, Xitong; Liao, Zhengping; Fu, Hongxin & Wang, Jufang. 2018. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid production with high butyrate/acetate ratio. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 102, s. 4511–4522.
- 36 Zygmunt, Bogdan & Banel, Anna. 2010. Formation, occurrence and determination of volatile fatty acids in environmental and related samples. *Proceedings of the 3rd WSEAS International Conference on Waste Management, Water Pollution, Air Pollution, Indoor Climate*, s. 476–481.
- 37 qPCR-menetelmä. 2019. Verkkoaineisto. Mikrobioni Oy. <<https://mikrobioni.fi/qpcr-menetelma/>>. Luettu: 11.7.2019.
- 38 Enari, T-M. & Mäkinen, V. 1993. *Panimotekniikka*. Porvoo: Kirjapaino t.t.
- 39 Biologisten tekijöiden luokitus ja laboratorioiden eristystasot. 2018. Verkkoaineisto. Terveystieteiden ja hyvinvoinninlaitos THL. <<https://thl.fi/fi/web/infektiaudit/laboratoriotoiminta/biologisten-uhkien-osaamiskeskus/bioturva/biologisten-tekijoiden-luokitus-ja-laboratorioiden-eristystasot>>. Luettu 16.6.2019.

Biologisten tekijöiden luokitus

Bakteerien luokittelu neljään eri luokkaan niiden potentiaalisen riskin mukaan.

Vaarallisuusluokkia on yhteensä neljä ja mikrobit jaetaan niihin niiden aiheuttaman vaaran mukaan [39].

- Ryhmään 1 kuuluvat mikrobit eivät todennäköisesti aiheuta ihmisille sairauksia.
- Ryhmään 2 kuuluvat mikrobit voivat aiheuttaa sairastumisen henkilölle, joka käsittelee kyseistä mikrobia. Tähän luokkaan kuuluvat mikrobit eivät kuitenkaan aiheuta vaaraa väestömittakaavassa.
- Ryhmään 3 kuuluvat mikrobit voivat aiheuttaa sairastumisen niiden käsittelijälle ja niitä koskee myös väestöön leviämisen vaara, mutta ehkäisykeino tai hoito on olemassa.
- Ryhmään 4 kuuluvien mikrobien aiheuttamille sairauksille ei ole olemassa ehkäisykeinoa tai hoito

Kasvatusalustojen koostumukset

Tutkimuksessa käytettyjen kasvatusalustojen koostumukset.

PYF pH 7.0

Fruktoosi 5 g/l
Hiivauute 10 g/l
Tryptoni 5 g/l
Peptoni 5 g/l
L-kysteiinihydrokloridi 0,5 g/l
Tween 80® 1 ml/l
Na₂HPO₄ 2 g/l

MRS pH 6.2

Glukoosi 20 g/l
Lihauute 8 g/l
Hiivauute 4 g/l
Peptoni 10 g/l
K₂HPO₄ 2 g/l
MgSO₄ · 7H₂O 0,2 g/l
MnSO₄ · 4H₂O 0,05 g/l
C₂H₃NaO₂ · 3 H₂O 5 g/l
C₆H₁₇N₃O₇ 2 g/l

RCM pH 6.8

Glukoosi 5 g/l
Hiivauute 13 g/l
Peptoni 10 g/l
Glukoosi 5 g/l
Tärkkelys 1 g/l
Natriumkloridi 5 g/l
Natriumasetaatti 3 g/l
L-kysteiinihydrokloridi 0,5 g/l
Agar 0,5 g/l

Minimaalialusta pH 6.8

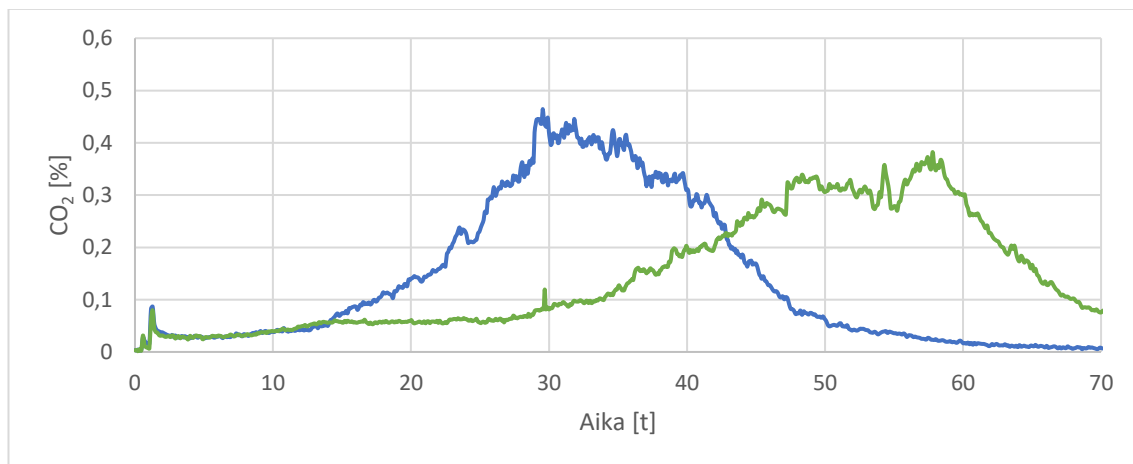
Omenamehu 250 ml/l
L-kysteiinihydrokloridi 0,5 g/l
Vitamiiniliuos 1 ml/l
 Biotiini 0,5 g/l
 Pyridoksiini 20 mg/l
 Kalsium-pantotenaatti 20 mg/l
Mineraaliliuos 40 ml/l
 CaCl₂ 0,125 g/l
 MgSO₄ · 7H₂O 0,125 g/l
 K₂HPO₄ 1 g/l
 NaHCO₃ 1 g/l
 NaCl 2 g/l
 (NH₄)₂SO₄ 2,5 g/l
 MnSO₄ · H₂O 0,05 g/l
 FeSO₄ · 7H₂O 0,05 g/l
 ZnSO₄ · 7H₂O 0,05 g/l
 CoSO₄ · 6H₂O 0,005 g/l

modifioitu RCM pH 6.8

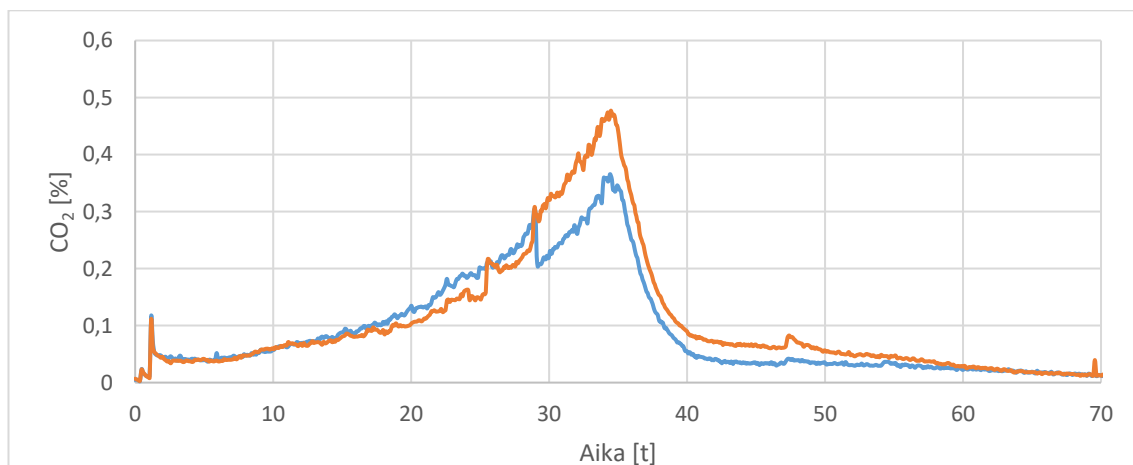
Hiivauute 13 g/l
Peptoni 10 g/l
Glukoosi 5 g/l
Tärkkelys 1 g/l
Natriumkloridi 5 g/l
Natriumasetaatti 3 g/l
L-kysteiinihydrokloridi 0,5 g/l
Agar 0,5 g/l

Kaali-RCM-fermentoinnin hiilidioksidikäyrät

Hiilidioksidin prosentuaaliset osuudet ulostulokaasusta eri fermentointimenetelmillä kaali-RCM-kasvatusalustalla.



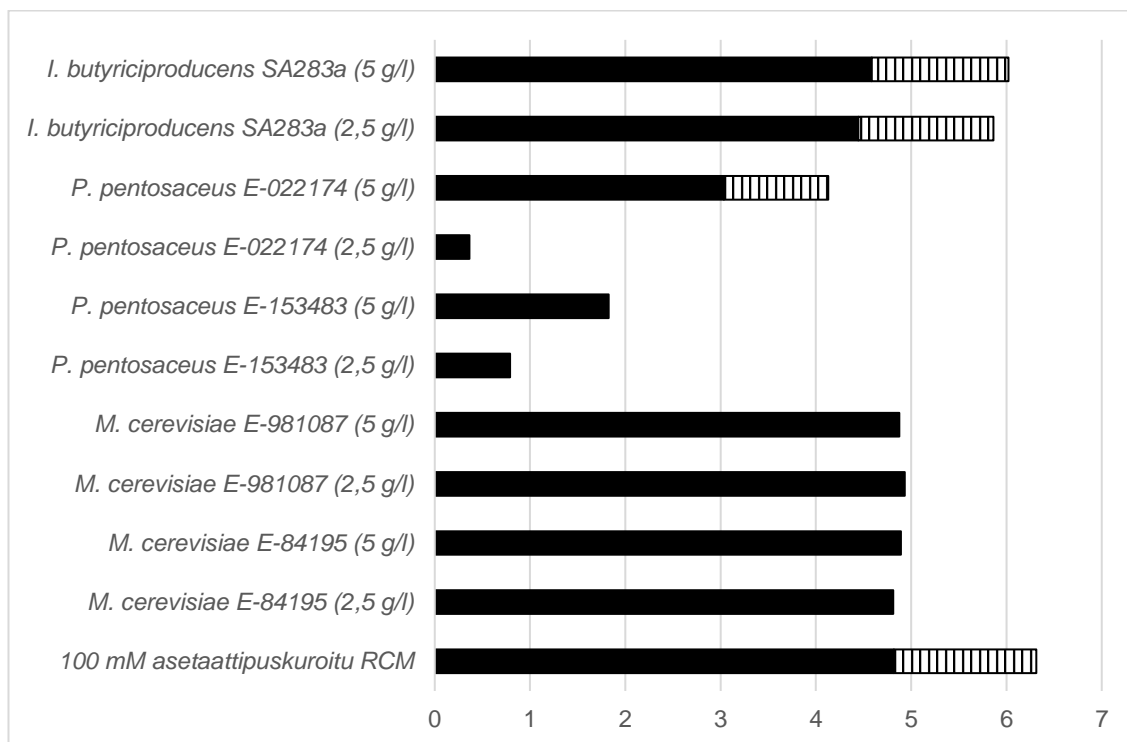
Kuva 1. Hiilidioksidin prosentuaalinen osuus ulostulokaasusta panos-syöttöfermentoinnin aikana. Fermentoinnit tehtiin duplikaatteina ja tulokset on esitetty kahtena erillisenä käyränä kuvaajassa.



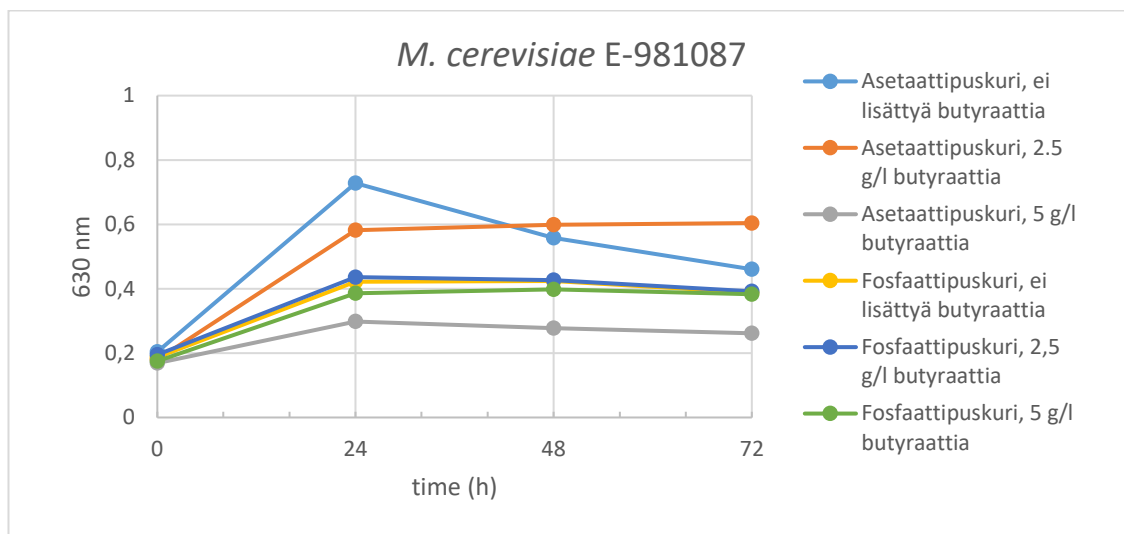
Kuva 2. Hiilidioksidin prosentuaalinen osuus ulostulokaasusta panosfermentoinnin aikana. Fermentoinnit tehtiin duplikaatteina ja tulokset on esitetty kahtena erillisenä käyränä kuvaajassa.

Bakteerikantojen seulonta – substraattien kulutus ja kasvukäyrät

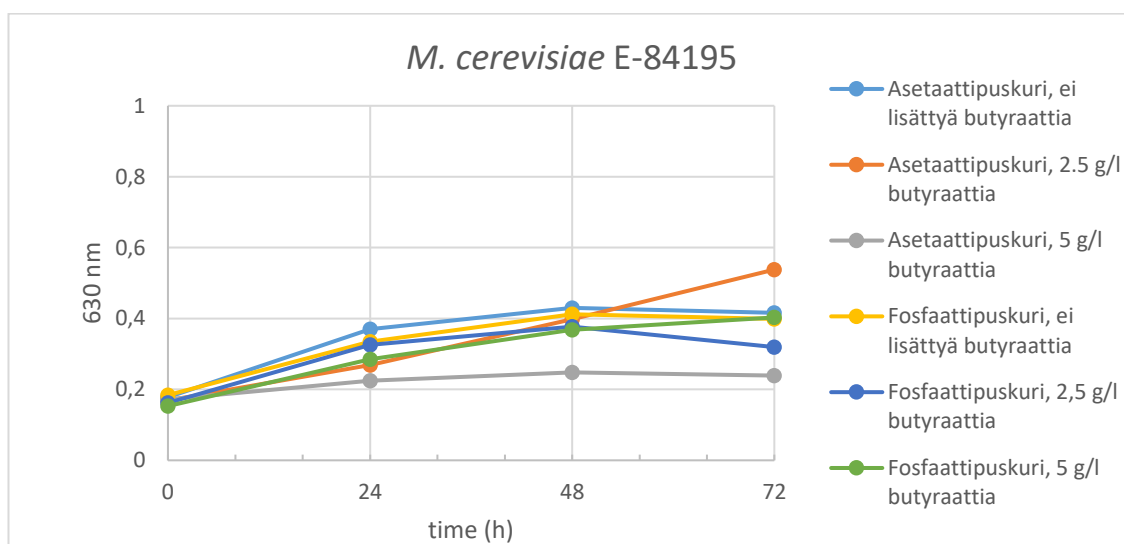
Bakteerikantojen seulonta perustui niiden kykyyn kasvaa alustoilla, joihin oli lisätty butyraattia eli voi-happoa. Kasvua seurattiin vertaamalla kasvatusten substraattipitoisuuksia kontrollinäytteeseen 72 tuntia inokulaatiosta (kuva 1) sekä mittaamalla kasvatusten sameutta spektrofotometrisesti (kuvat 2–6).



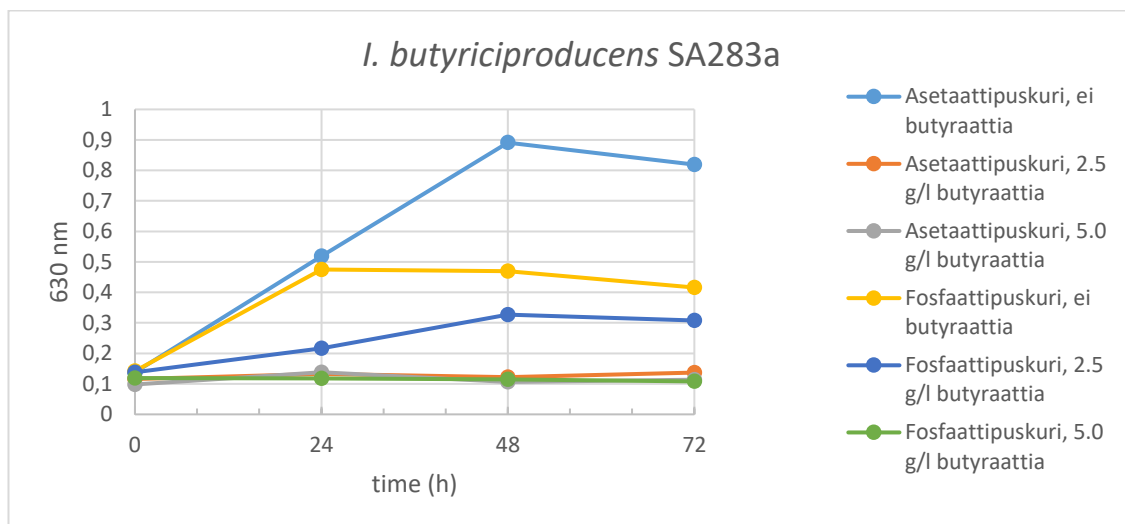
Kuva 1. Glukoosipitoisuus (musta) ja fruktoosipitoisuus (raidallinen) kasvatuksen lopussa (72 t) kahdella eri voi-happopitoisuudella kasvatusalustassa (2,5 g/l ja 5,0 g/l). Kontrollinäytteenä asetaattipuskuroitu RCM-kasvatusalusta. Kasvatusolosuhteet bakteerikannan mukaan: *M. cerevisiae* 30 °C, anaerobinen; *I. butyriciproducens* 37 °C, anaerobinen ja *P. pentosaceus* 37 °C, aerobinen. Kasvatustilavuus 20 ml.



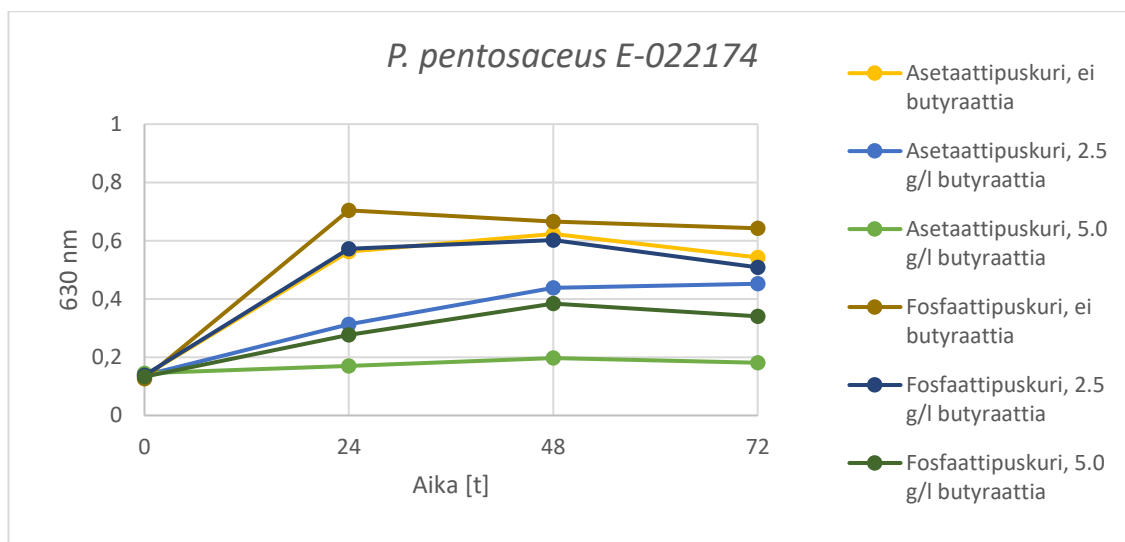
Kuva 2. *Megasphaera cerevisiae* E-981087 -kannan kasvukäyrät kuudella eri kasvualustalla.



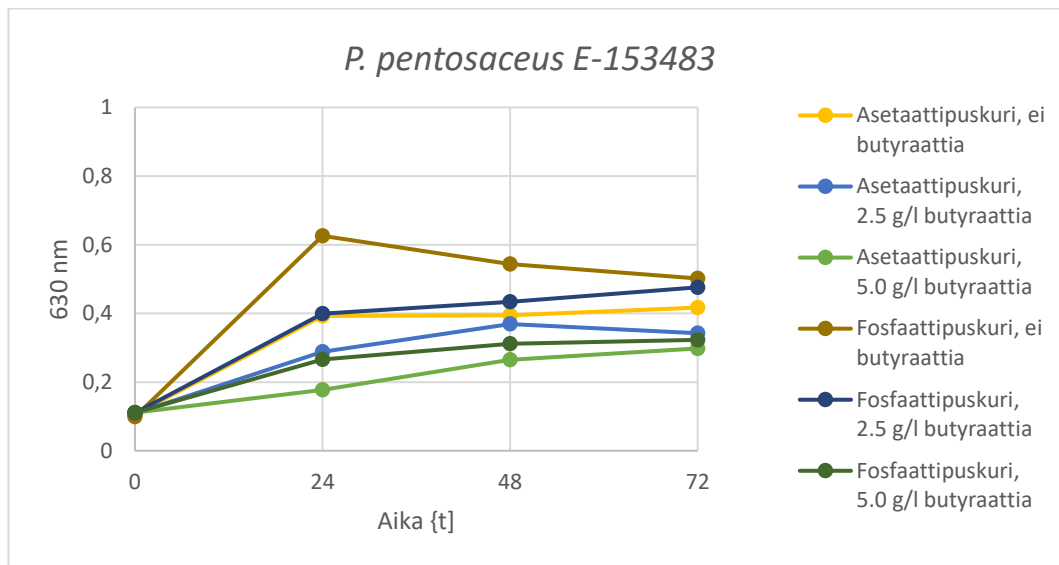
Kuva 3. *Megasphaera cerevisiae* E-84195 -kannan kasvukäyrät kuudella eri kasvualustalla.



Kuva 4. *Intestinimonas butyriciproducens* SA283a -kannan kasvukäyrät kuudella eri kasvualustalla.



Kuva 5. *Pediococcus pentosaceus* E-022174 -kannan kasvukäyrät kuudella eri kasvualustalla.

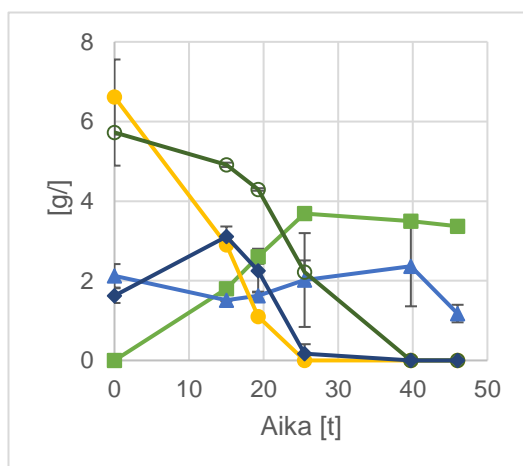


Kuva 6. *Pediococcus pentosaceus* E-153483 -kannan kasvukäyrät kuudella eri kasvualustalla.

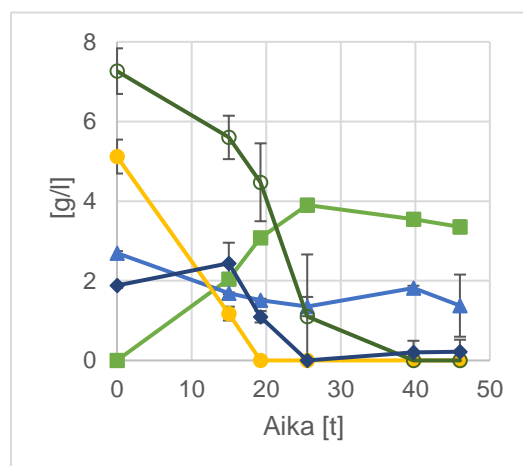
Fermentointinäytteiden sokeri- ja happopitoisuudet

Panosfermentoinnit sivuvirta-alustoilla ilman puskuria tai epäorgaanisella PIPES -puskurilla on esitetty kuvissa 1–4. Asetaattipuskurin poisjättäminen laski alustan etikkahappopitoisuutta, mikä vaikutti negatiivisesti muodostuvan voihapsen määrään. Tulokset on esitetty kahden kasvatuksen keskiarvona ja keskihajontaa kuvataan virhepalkeilla.

a)

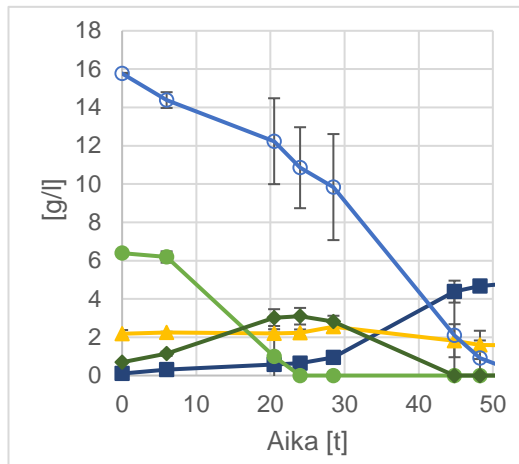


b)

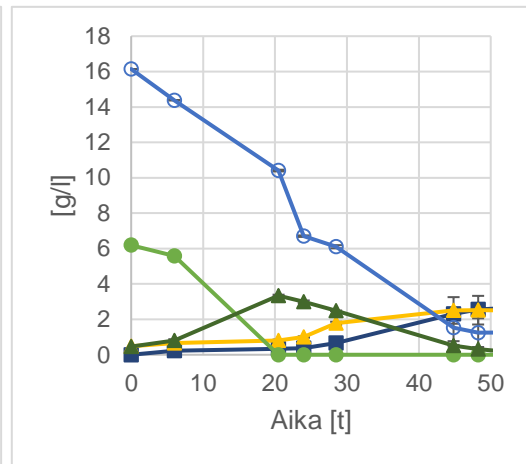


Kuva 1. Panosfermentointi kaali-RCM-kasvatusalustalla (vasen) ja kaali-omena-RCM-kasvatusalustalla (oikea) ilman puskuria. Voihapsen (■), maitohapon (◆), etikkahapon (▲), glukoosin (●) ja fruktoosin (○) pitoisuudet esitetty eri ajan hetkillä.

a)



b)



Kuva 2. Panosfermentointi omena-RCM-kasvatusalustalla (vasen) ja omena-minimaalialustalla (oikea) hyödyntäen epäorgaanista PIPES-puskuria. Voihapon (■), maitohapon (◆), etikkahapon (▲), glukoosin (●) ja fruktoosin (○) pitoisuudet esitetty eri ajan hetkillä.